



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

“AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA, BIOQUÍMICA Y MOLECULAR DE *Agrobacterium tumefaciens* A PARTIR DE TEJIDOS VEGETALES INFECTADOS”

Trabajo de titulación:

Tipo: Proyecto de investigación

Presentado para optar al grado académico de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

AUTOR: JHONATAN WLADIMIR TANDAPILCO LLUMITAXI

DIRECTOR: Ing. ANA RAFAELA PACURUCU REYES MSc.

Riobamba - Ecuador

2020

©2020, Jhonatan Wladimir Tandapilco Llumitaxi.

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

Yo, Jhonatan Wladimir Tandapilco Llumitaxi, declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y los resultados del mismo son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

Como autor asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación; El patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Riobamba, 23 de diciembre del 2020



Jhonatan Wladimir Tandapilco Llumitaxi

025000871-1

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL


El Tribunal del trabajo de titulación certifica que: El trabajo de titulación: Tipo: Proyecto de investigación, **“AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA, BIOQUÍMICA Y MOLECULAR DE *Agrobacterium tumefaciens* A PARTIR DE TEJIDOS VEGETALES INFECTADOS”**, realizado por el señor: **JHONATAN WLADIMIR TANDAPILCO LLUMITAXI**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del trabajo de titulación, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal Autoriza su presentación.

FIRMA

FECHA

Ing. María Soledad Núñez Moreno.
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

MARIA
SOLEDAD
NUNEZ
MORENO




Firmado digitalmente por
MARIA SOLEDAD
NUNEZ MORENO
Fecha: 2021.01.14
10:42:50 -05'00'

2020-12-23

Ing. Ana Rafaela Pacurucu Reyes, MSc.
**DIRECTOR/A DEL TRABAJO
DE TITULACIÓN**

ANA RAFAELA
PACURUCU
REYES



Firmado digitalmente
por ANA RAFAELA
PACURUCU REYES
Fecha: 2021.01.13
22:35:14 -05'00'

2020-12-23

Ing. Yolanda Dolores Díaz Heredia, PhD.
MIEMBRO DE TRIBUNAL

YOLANDA
DOLORES
DIAZ HEREDIA



Firmado digitalmente por
YOLANDA DOLORES
DIAZ HEREDIA
Fecha: 2021.01.14
15:42:31 -05'00'

2020-12-23

DEDICATORIA

Me complace dedicar el presente trabajo de titulación a mis padres, Víctor Manuel y Anita Mercedes; quienes fueron mi sostén, sin ustedes no hubiese sido posible culminar este proyecto universitario y de vida.

A mis hermanos/as y mi sobrina Nathalia, estoy convencido que ella superará mis logros personales y académicos.

A la comunidad científica ecuatoriana, quienes demuestran que en Ecuador si se puede hacer ciencia y que con su labor pueden transformar vidas.

Jhonatan Wladimir

AGRADECIMIENTO

A mis padres Víctor y Mercedes, les estaré eternamente agradecido por el tiempo y recursos depositados en mi educación, y sobre todo por su amor, sus enseñanzas, y valores, por demostrarme que todo esfuerzo viene acompañado de una grata recompensa y recordarme siempre el compromiso moral que tengo con la sociedad.

A mis hermanos Judith, Rosa, Manuel, Mercedes, Gloria y Jesica; por haberme apoyado en todas las etapas de mi vida; así mismo, a mis sobrinos Xavier y Nathalia por motivarme a ser mejor persona, ser un amigo con quien puedan contar incondicionalmente.

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, por abrirme sus puertas y brindarme un espacio en las aulas de la Facultad de Ciencias; porque me ha dado la oportunidad de crecer como profesional e individuo, y sobre todo me permitió conocer maravillosas personas y conformar una nueva familia con quienes compartir esta casualidad cósmica llamada vida.

A mis mejores amigos: Chelo, Oscar, Amy, Kary, Héctor, Liz, Jhoel y Bryan H., por el apoyo, por los consejos, y por el montón de anécdotas que tenemos para recordar cada vez que nos reunamos; por supuesto, al resto de mis poliamigos que me acompañaron en gran parte de la carrera: Isma, Karol, Vale, Eve, Alex fer, Christian, Gio, Gabo, Gaby, Vero y mi muy querida Danny Yánez.

A mis maestros, principalmente a mi tutora, Ing. Rafaela Pacurucu, de quien tuve el placer de aprender a lo largo de mi estancia académica, aprovecho para expresarle mi respeto y admiración; agradezco también por todo el apoyo, asesoramiento y motivación brindada en el presente trabajo de investigación. De igual manera a la Dra. Jenny Moreno, Ing. Pao Chiluiza, Dr. Gerardo Medina, Dr. Gerardo León, Dr. Celso Recalde, Ing. Alex Gavilanes, Dr. Raúl Benavides, Ing. Andrés Beltrán y a la Ing. Sofía Godoy.

A Francisco Mosquera, técnico de laboratorio en BioSin-Biociencias, instructor y asistente de investigación en IDgen, por la capacitación en técnicas de biología molecular, agradecerle también por el apoyo en la investigación y por presentarme con el Dr. Francisco Flores, quién permitió vincularme a uno de los proyectos de investigación desarrollados en IDgen.

Al Ing. Jorge García, técnico del Laboratorio de Identificación Molecular IDgen, por la capacitación y asistencia técnica en el cultivo de microorganismos, manejo de equipos, mantenimiento de cepas y refinamiento en el uso de técnicas de diagnóstico molecular; de igual manera a Robert, Karla, Jefferson, Mateo, Sharon, Gabriel y Miguel quienes se encontraban realizaban pasantías en IDgen e hicieron de este tiempo una estancia enriquecedora.

Agradezco de manera muy especial al Dr. Francisco Flores, docente investigador en la carrera de Biotecnología de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, y propietario del Laboratorio de Identificación Molecular IDgen, por brindarme la oportunidad de colaborar en el proyecto de obtención de controles positivos para diagnóstico molecular de fitopatógenos; también, por la asesoría técnica y científica y por permitirme hacer uso de las instalaciones de IDgen para realizar pasantías mientras se llevaba a cabo el presente proyecto de investigación.

Jhonatan Wladimir

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	xii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiii
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	xiv
ÍNDICE DE ANEXOS	xv
RESUMEN.....	xvi
SUMMARY	xvii
INTRODUCCIÓN	1

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL.....	5
1.1. Enfermedad de la agalla de la corona	5
1.1.1. <i>Impacto de la agalla de la corona de la rosa en el Ecuador</i>	5
1.1.2. <i>Síntomas</i>	6
1.1.3. <i>Etiología</i>	6
1.1.3.1. <i>Diseminación</i>	7
1.1.3.2. <i>Tendencia para la infección</i>	7
1.1.3.3. <i>Factores que promueven la infección</i>	7
1.1.4. <i>Métodos de manejo preventivos y control biológico</i>	8
1.1.4.1. <i>Métodos preventivos</i>	8
1.1.4.2. <i>Control biológico</i>	8
1.2. Género <i>Agrobacterium</i>	8
1.2.1. <i>Taxonomía del género Agrobacterium</i>	9
1.2.2. <i>Clasificación del género Agrobacterium en biovars</i>	10
1.2.2.1. <i>Complejo de Agrobacterium tumefaciens o Biovar 1</i>	11

1.2.2.2.	<i>Plásmido Ti</i>	12
1.2.2.3.	<i>Opinas</i>	12
1.3.	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> como herramienta de ingeniería genética	13
1.4.	Aislamiento y caracterización de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	13
1.4.1.	<i>Medios de cultivo semi-selectivos</i>	14
1.4.2.	<i>Caracterización morfológica bacteriana</i>	14
1.4.2.1.	<i>Morfología macroscópica de colonias</i>	15
1.4.2.2.	<i>Morfología microscópica mediante aplicación de Tinción Gram</i>	16
1.4.3.	<i>Pruebas de caracterización bioquímicas</i>	16
1.4.3.1.	<i>Producción de catalasa</i>	17
1.4.3.2.	<i>Producción de oxidasa</i>	17
1.4.3.3.	<i>Aclaramiento ácido en PDA-CaCO₃</i>	18
1.4.3.4.	<i>Prueba SIM</i>	18
1.4.3.5.	<i>Capacidad de crecimiento en telurito de potasio</i>	18
1.4.3.6.	<i>Producción de 3-cetolactosa</i>	19
1.4.4.	<i>Caracterización molecular de <i>Agrobacterium tumefaciens</i></i>	19
1.4.4.1.	<i>Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</i>	19
1.4.4.2.	<i>PCR multiplex (mPCR)</i>	20
1.4.4.3.	<i>Electroforesis en gel de agarosa</i>	20
1.4.4.4.	<i>Secuenciación de amplicón del ADNr 16S</i>	21

CAPÍTULO II

2.	MARCO METODOLÓGICO	22
2.1.	Lugar del desarrollo de la investigación	23
2.2.	Materiales y equipos	23

2.3.	Tipo y Diseño de Investigación	23
2.3.1.	<i>Por el tipo de investigación</i>	23
2.3.2.	<i>Por el diseño de investigación</i>	23
2.4.	Unidad de análisis	24
2.5.	Población de estudio	24
2.6.	Etapas de la investigación	24
2.6.1.	<i>Tratamiento de la muestra</i>	24
2.6.1.1.	<i>Desinfección del tejido</i>	24
2.6.1.2.	<i>Maceración del tejido</i>	24
2.6.2.	<i>Aislamiento bacteriano</i>	25
2.6.2.1.	<i>Preparación de medios de cultivo semiselectivos</i>	25
2.6.2.2.	<i>Enriquecimiento en medio semiselectivo D1</i>	27
2.6.2.3.	<i>Inoculación de muestras</i>	27
2.6.2.4.	<i>Incubación de placas</i>	27
2.6.2.5.	<i>Aislamiento y resiembra en medio semiselectivo y purificación de colonias</i>	27
2.6.3.	Caracterización morfológica	28
2.6.3.1.	<i>Morfología y cromogénesis de las colonias</i>	28
2.6.3.2.	<i>Tinción Gram</i>	29
2.6.4.	Caracterización bioquímica	29
2.6.4.1.	<i>Catalasa</i>	29
2.6.4.2.	<i>Oxidasa</i>	30
2.6.4.3.	<i>Aclaramiento ácido en PDA – CaCO₃</i>	30
2.6.4.4.	<i>Prueba SIM</i>	31
2.6.4.5.	<i>Crecimiento en YEM - K₂TeO₃</i>	31
2.6.4.6.	<i>3-cetolactosa</i>	32
2.6.5.	Caracterización molecular	33

2.6.5.1.	<i>Extracción de ADN</i>	33
2.6.5.2.	<i>Purificación de ADN</i>	33
2.6.5.3.	<i>Cuantificación de ADN</i>	34
2.6.5.4.	<i>Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</i>	34
2.6.5.5.	<i>Revelado por electroforesis en gel de agarosa</i>	35

CAPÍTULO III

3.	MARCO DE DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	37
3.1.	Formulación de medios de cultivo	37
3.2.	Aislamiento de cepas bacterianas	37
3.2.1.	<i>Crecimiento en medios semiselectivos</i>	37
3.2.2.	<i>Resiembra y capacidad de crecimiento en medio D1</i>	39
3.3.	Caracterización morfológica	41
3.3.1.	<i>Morfología macroscópica</i>	41
3.3.2.	<i>Morfología microscópica</i>	43
3.4.	Caracterización bioquímica	44
3.5.	Caracterización molecular	49
3.5.1.	<i>Cuantificación de ADN</i>	49
3.5.2.	<i>Producto de PCR para la región virD2 e ipt</i>	50
3.5.3.	<i>Producto de PCR para la región del ADNr 23S</i>	52
3.5.4.	<i>Secuenciación de la cepa PAT07</i>	53

CONCLUSIONES	55
---------------------------	----

RECOMENDACIONES	57
------------------------------	----

GLOSARIO

BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1:	Clasificación taxonómica de <i>Agrobacterium</i>	10
Tabla 2-1:	Principales características que diferencian las especies del género <i>Agrobacterium</i> ...	11
Tabla 1-2:	Medio de cultivo semiselectivo D1	25
Tabla 2-2:	Medio de cultivo sólido a base de sales AT	26
Tabla 3-2:	Medio de cultivo LB para mantenimiento.	27
Tabla 4-2:	Medio de cultivo para verificar la producción de 3-cetolactosa.....	32
Tabla 5-2:	Secuencia de primers empleados en PCR multiplex y PCR convencional.....	35
Tabla 1-3:	Número de colonias aisladas de dos medios de cultivo semi-selectivos.	37
Tabla 2-3:	Caracterización morfológica macroscópica de colonias aisladas con medios semi-selectivos.....	42
Tabla 3-3:	Caracterización morfológica microscópica de cepas presuntas de <i>A. tumefaciens</i>	43
Tabla 4-3:	Caracterización bioquímica de cepas presuntas de <i>A. tumefaciens</i>	44
Tabla 5-3:	Matriz de determinación de concentración y calidad del ADN.....	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-3:	Revelado del producto de mPCR en gel de agarosa al 1%.	51
Figura 2-3:	Revelado del producto de PCR en gel de agarosa al 1%..	52
Figura 3-3:	Revelado del producto de mPCR en gel de agarosa al 1%..	53

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-1:	Nomenclatura de especies del complejo <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	12
Gráfico 1-2:	Diagrama de las etapas de la investigación	22
Gráfico 1-3:	Cepas bacterianas obtenidas en dos etapas de aislamiento con medios semiselectivos: sales AT, D1-K2TeO3, D1 y D1 pre-enriquecido.....	40
Gráfico 2-3:	Clasificación bacteriana mediante tinción Gram.....	43
Gráfico 3-3:	Resultados de la caracterización bioquímica de 19 cepas putativas de <i>A. tumefaciens</i>	45
Gráfico 4-3:	Espectrofotograma de ADN de PAT08 medida a 260 nm con NanoDrop 2000.....	50

ÍNDICE DE ANEXOS

- ANEXO A:** ELABORACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO SEMI-SELECTIVOS.
- ANEXO B:** ESTERILIZACIÓN Y MACERACIÓN DEL TEJIDO VEGETAL.
- ANEXO C:** SIEMBRA E INCUBACIÓN DE PLACAS.
- ANEXO D:** TINCIÓN GRAM Y REPIQUE EN CUADRICULA.
- ANEXO E:** REGISTRO FOTOGRÁFICO DE PRUEBAS BIOQUÍMICAS.
- ANEXO F:** REGISTRO FOTOGRÁFICO DE CARACTERIZACIÓN MOLECULAR.
- ANEXO G:** SECUENCIA DE LA CEPA PAT07 REALIZADA POR MACROGEN.

RESUMEN

Se trató de obtener cepas salvajes de *Agrobacterium tumefaciens* patógeno causante de la enfermedad de la agalla de la corona, mediante el aislamiento a partir de tumores de rosas y caracterización por medio de técnicas bioquímicas y moleculares, estableciendo su taxonomía a fin de incorporarlas al cepario de controles positivos del Laboratorio de Identificación Molecular (IDgen). El aislamiento se llevó a cabo en dos etapas empleando muestras de rosas proporcionadas por IDgen: la primera consistió en macerar las muestras e inocularlas directamente en placas con dos tipos de medios semiselectivos, mientras que para la segunda se usó únicamente medio D1 con una etapa previa de enriquecimiento selectivo. Las placas se incubaron a 28 °C durante 3-7 días, y sus aislados se caracterizaron de acuerdo con la morfología macroscópica y tinción Gram; las cepas que correspondieron a bacilos Gram negativos se sometieron a las pruebas bioquímicas de producción de catalasa, oxidasa, sulfuro, motilidad a 28 y 35 °C, aclaramiento ácido, telurito de potasio y 3-cetolactosa. Posteriormente, se realizó una reacción en cadena de la polimerasa con primers específicos para las regiones virD2, ipt y ARNr 23S. De un total de 21 cepas que fueron caracterizadas morfológicamente, 17 resultaron ser bacilos Gram negativos y, tras la caracterización bioquímica, ninguna cepa fue capaz de producir 3-cetolactosa; 9 se sometieron a caracterización molecular, de las cuales solo una (PAT07) presentó un amplicón de aproximadamente 750pb con primers virD2 e ipt, esta se amplificó y secuenció con primers universales para el ARNr 16S, determinando un 98.44% de identidad con *Pseudomonas putida*, bacteria asociada a la agalla coronaria en rosas, de manera que sería adecuado reajustar los criterios de aislamiento y caracterización bacteriana, a fin de impedir el desarrollo de *Pseudomonas* spp. que interfieran sobre el crecimiento de *A. tumefaciens*.

Palabras clave: <BIOTECNOLOGÍA>, <MICROBIOLOGÍA>, <AGALLA DE LA CORONA>, <AGROBACTERIUM TUMEFACIENS>, <ENRIQUECIMIENTO SELECTIVO>, <CARACTERIZACIÓN BACTERIANA> <PCR CONVENCIONAL Y MULTIPLEX>, <SECUENCIACIÓN DE ARNr 16S>.



Firmado electrónicamente por:
**LUIS ALBERTO
CAMINOS
VARGAS**



0540-DBRAI-UPT-2021

SUMMARY

Some pathogen *Agrobacterium Tumefaciens* wild strains causing crown gall were intended to obtain through the isolation of tumors in roses and its characterization through biochemical and molecular techniques which allow establishing their taxonomy in order to add them to the positive control strain collection at the Laboratory of Molecular Identification (IDgen). The isolation process had two stages and was carried out using roses samples given by IDgen: the first stage had to do with the samples maceration and their direct inoculation into plates with two types of semi-selective media, while for the second stage it was only necessary to use half D1 with a previous stage of selective enrichment. The plates were incubated at 28°C during 3-7 days and their isolates were characterized according to the macroscopic morphology and Gram staining; the strains corresponding to Gram negative bacilli were put under catalase, oxidase, sulfide, motility at 28 and 35°C, acid clearance, potassium tellurium and 3-ketolactose production biochemical tests. Then, it was possible to carry out a chain reaction of polymerase with specific primers for virD2, ipt and ARNr23S regions. From a total of 21 morphologically characterized strains, 17 were Gram negative bacilli and after the biochemical characterization, any of the trains was able to produce 3-ketolactose; 9 were put under molecular characterization; from which, only one (PAT07) reflected an approximate amplicon of 750pb with virD2 and ipt primers, this was amplified and sequenced with universal primers for ARNr 16S, determining an identity of 98.44% for *Pseudomonas putida*, bacterium which is associated with crown gall in roses, so that it would be appropriate to readjust the isolation criteria as well as the bacterial characterization in order to prevent the development of *Pseudomonas* spp which interfere the growth of *A. tumefaciens*.

Keywords: <BIOTECHNOLOGY>, <MICROBIOLOGY>, <CROWN GALL>, <AGROBACTERIUM TUMEFACIENS>, <SELECTIVE ENRICHMENT>, <BACTERIAL CHARACTERIZATION>, <CONVENTIONAL AND MULTIPLEX PCR>, <16S ARNr SEQUENCING>.

INTRODUCCIÓN

Identificación del Problema

El control de plagas y enfermedades en cultivos agrícolas de interés comercial tiene la finalidad de garantizar la producción y la calidad de productos de exportación. Esto ha promovido el uso indiscriminado de plaguicidas de amplio espectro, altamente tóxicos para las comunidades microbianas del suelo en general, lo que genera desequilibrio ecológico, disminuyendo la supresividad del suelo frente a fitopatógenos, tanto endémicos como foráneos, pudiendo alterar las condiciones del suelo hasta el punto de ocasionar el deterioro ambiental (BAUTISTA et al., 2008; HERNÁNDEZ et al., 2017). Por otro lado, se tiene el control biológico con formulaciones de biopesticidas, que contrario a los pesticidas procedentes de síntesis química, estos atacan de forma específica al patógeno de interés. La eficacia del control biológico depende del diagnóstico oportuno del fitopatógeno; para ello existen métodos microbiológicos clásicos y técnicas moleculares modernas; estas son más sensibles y requieren menos tiempo, en comparación a los métodos convencionales (NAVARRETE et al., 2014).

La identificación exacta de la especie microbiana permite dar un tratamiento preciso. Sin embargo, si el patógeno se caracteriza únicamente con pruebas morfológicas y bioquímicas, no existe la certeza de que la bacteria corresponda a la especie reportada, debido a que en el suelo existen varios tipos de bacterias que comparten características muy similares. En el caso del género *Agrobacterium*, el uso de medios semiselectivos puede suprimir el desarrollo de ciertas especies (RESTREPO y VARGAS, 2007). Por otro lado, este género se caracteriza por la capacidad de transferencia horizontal de ADN plasmídico, lo que puede ocasionar mutaciones, dando como resultado a individuos que contengan el plásmido Ti y no necesariamente sean patógenos. Si únicamente se emplean técnicas moleculares se puede tener resultados contradictorios puesto que este método se basa en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), la cual amplifica una secuencia específica de material genético que es determinada por los primers o iniciadores empleados, pudiendo dar como resultados falsos positivos o falsos negativos. Con la finalidad de identificar la especie exacta del patógeno se debe emplear los métodos de detección microbiológicos, bioquímicos y moleculares de forma combinada (ALIPPI et al., 2011).

Justificación de la investigación

El control fitosanitario es una disciplina que requiere de técnicas efectivas para dar un diagnóstico oportuno del tipo de plaga que está afectando a un determinado cultivo agrícola; es decir, que la gestión de las enfermedades depende en gran parte de la identificación del patógeno, una vez conocido este, pueden tomarse medidas para mitigar los efectos y su propagación hacia cultivos contiguos (RESTREPO y VARGAS, 2007). Entre las técnicas de manejo de la infección están la selección de sitio de cultivo, rotación de cultivos, erradicadores químicos y control biológico; evidentemente la adición de fertilizantes y el control con plaguicidas incrementa la carga química del suelo, el control químico consiste en el uso de derivados de creosota, soluciones de cobre, lejías como hipoclorito de sodio y bromuro de metilo que actúan superficialmente, por lo tanto, son poco efectivos en infecciones sistémicas, además, requiere de mucha mano de obra incrementando los costos de producción (KADO, 2002). Tanto los fertilizantes como los plaguicidas constituyen una fuente significativa de metales pesados (Cd, Cr, Cu, Hg, Mo, Ni y Zn) estos tienden a acumularse, alteran y reducen la microbiota nativa del suelo, se infiltran en depósitos de agua subterránea, acidifican el suelo incrementando la biodisponibilidad de otros metales pesados, además, son incorporados a la cadena trófica mediante las plantas, estas al ser consumidas por organismos superiores aportan metales pesados que se biomagnifican causando problemas de salud tanto en animales como en el ser humano (LENART-BORON y BORON, 2014). La detección de fitopatógenos se puede llevar a cabo mediante técnicas clásicas de microbiología, mediante técnicas modernas de biología molecular o combinación de ambas para incrementar la veracidad de los resultados. Las técnicas moleculares se basan en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), misma que requiere de cebadores que se acoplen a una región específica de la cadena de ADN de interés que debe ser característica de cada taxón, de preferencia se emplean regiones conservadas del genoma; los iniciadores pueden ser de tipo universal o se pueden diseñar iniciadores específicos. Luego, mediante transformación bacteriana se puede insertar la secuencia de nucleótidos que identifica al patógeno dentro de un plásmido que pueda replicarse al interior de células viables de cepas bacterianas, de tal manera que se obtiene un control positivo para la detección eficaz de patógenos mediante PCR (MONREAL et al., 2005; RESTREPO y VARGAS, 2007; NAVARRETE et al., 2014). El diagnóstico molecular presenta una serie de ventajas frente a los métodos convencionales como: mayor grado de sensibilidad para identificar microorganismos a nivel de especies, el tiempo de detección se reduce a horas y se puede partir de cantidades mínimas de material genético, incluso con ácidos nucleicos extraídos directamente de matrices complejas como tejido vegetal, suelo o agua (MONREAL et al., 2005).

La Biotecnología Ambiental es una disciplina que integra los principios de la biotecnología orientado hacia la solución de problemas ambientales. Tiene como objetivo primordial mantener la calidad del ambiente, para lo cual hace uso de técnicas modernas que permitan proteger y recuperar recursos deteriorados, como es el caso del suelo agrícola. Hay que reconocer que la Biotecnología Ambiental no se limita únicamente al control de la contaminación sino que también interviene en actividades productivas; según BÉCARES (2014) se considera que muchas de las disciplinas de la biotecnología se derivan de la Biotecnología Ambiental, tal es el caso de la Agrobiotecnología que aprovecha los recursos del ambiente; además, esta estudia las interacciones entre los organismos, desde virus hasta plantas.

Para el desarrollo del presente trabajo de investigación se cuenta con la facilidad prestada por el Doctor Francisco Flores, propietario del Laboratorio de Identificación Molecular IDgen, ubicado en la ciudad de Quito, quien brinda las facilidades del uso de las instalaciones y equipos, así como con asesoría técnica en cuanto a metodología y protocolos de laboratorio, IDgen actualmente maneja el desarrollo de técnicas moleculares para diagnóstico de fitopatógenos.

Objetivos

Objetivo general

- Aislar y caracterizar microbiológica, bioquímica y molecularmente *Agrobacterium tumefaciens* a partir de tejidos vegetales infectados.

Objetivos específicos

- Aislar al potencial patógeno de la enfermedad de la agalla de la corona de la rosa.
- Caracterizar morfológica y bioquímicamente al potencial patógeno a partir de tejido vegetal infectado.
- Verificar que el organismo se trate de *Agrobacterium tumefaciens* mediante amplificación por PCR y posterior secuenciación.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

1.1. Enfermedad de la agalla de la corona

El potencial fitopatogénico de *Agrobacterium tumefaciens* lo describen por primera vez SMITH y TOWNSEND (1907), luego que estudiaron las agallas que aparecían en la margarita de París. El aislamiento consistió en transferir las bacterias desde el tejido tumoral a placas con medio de cultivo; para su verificación realizaron pruebas de patogenicidad en plantas de durazno, tabaco y tomate, además, encontraron que existe mayor susceptibilidad de infección en tejidos jóvenes, por lo que recomendaron tener mayor control en etapas tempranas del desarrollo de los cultivos agrícolas.

Agrobacterium tumefaciens es conocida por su potencial como fitopatógeno; se trata de una bacteria Gram negativa presente en el suelo, perteneciente a la familia *Rhizobiaceae*; cuenta con un plásmido que produce tumores en cuello y raíces de más de 93 familias de plantas dicotiledóneas, entre estas: cultivos frutales, hortícolas, industriales, ornamentales y forestales. La infección está inducida por sustancias fenólicas excretadas por las heridas de las plantas dando lugar a la transferencia del ADN bacteriano. Este codifica una serie de enzimas que promueven la síntesis de fitohormonas, provocando la proliferación descontrolada de células vegetales atrofiadas y a la vez conformando tumores que obstaculizan los conductos de circulación de la sabia, la planta se marchita y muere, no obstante las bacterias permanecen latentes en el suelo; por esta razón, se considera como una enfermedad cuarentenaria que afecta gravemente a la producción agrícola (LACROIX y CITOVSKY, 2013).

1.1.1. Impacto de la agalla de la corona de la rosa en el Ecuador

Actualmente las rosas son uno de los cultivos de interés comercial y producto de exportación del Ecuador, la industria florícola tuvo su inicio en el año del 1983, un gran número de hectáreas fueron destinadas para la adecuación de invernaderos para el cultivo de rosas; sin embargo, para

el año 2008 Agrocalidad reportó brotes de agalla de la corona en cultivos de rosas, lo que ocasionó una reducción de 337 hectáreas destinadas a la producción de rosas, como resultado, el número de empleados de las florícolas se redujo en aproximadamente 16% (CIFUENTES et al., 2011).

1.1.2. Síntomas

Por lo general los tumores se ubican en las raíces y el tallo cerca de la superficie del suelo, aunque también suele detectarse en partes aéreas de la planta. Los tumores inicialmente se presentan como crecimiento descontrolado de raíces o del tallo, luego se van tornando esféricos y de color blanquecino, son bastante blandos; una vez alcanza su máximo vigor, las células periféricas empiezan a acumularse y morir adquiriendo un color pardo oscuro. A medida que el tumor crece este obstruye los conductos de la planta por donde circula el agua, ocasionando su marchitamiento paulatino, su presencia hace que la planta sea más susceptible al ataque de otros patógenos (BARRENO et al., 2011).

1.1.3. Etiología

De acuerdo con MORILLO y URBANO, (2011) *Agrobacterium tumefaciens* es un bacilo móvil que posee flagelos periféricos que presenta características morfológicas y fisiológicas particulares como:

- Tamaño: $0.7 - 0.8 \times 2.5 - 3.0 \mu\text{m}$.
- Disposición: sola o en pares.
- Movimiento: Poseen entre 1 – 4 flagelos.
- Capsulada.

- Gram negativa.
- Colonias en agar: pequeñas, blancas, circulares, lisas brillantes, translúcidas, enteras (varían en función del medio).
- En caldo presenta ligera turbidez con película fina.
- Temperaturas óptimas; 25 – 28 °C, letal 51 °C

1.1.3.1. Diseminación

Las bacterias usualmente se dispersan por actividades agrícolas, como al remover el suelo, por heridas causadas al emplear herramientas no desinfectadas, por contacto con la vestimenta de los trabajadores, por el agua de riego e incluso por el aire (MORILLO y URBANO, 2011).

1.1.3.2. Tendencia para la infección

La susceptibilidad que las plantas pueden tener a la infección se ve influenciada por la edad del cultivo, condiciones ambientales que reducen el vigor de la planta, por secreción de compuestos de señalización, pudiendo restituir la patogenicidad de aquellos organismos que permanecen latentes en el suelo (MORILLO y URBANO, 2011).

1.1.3.3. Factores que promueven la infección

Según BAUTISTA et al., (2008) los brotes de plagas, como agalla de la corona tiene que ver más con el deterioro de las condiciones del suelo, que por incidencia de patógenos foráneos, considerando que el suelo mantiene un alto grado de complejidad en cuanto a ecología microbiana, las actividades agrícolas, así como el uso de plaguicidas para el control de plagas, ocasionan la disminución de la supresividad del suelo frente a fitopatógenos, contribuyendo al brote de plagas.

Otros factores a considerar son la estación o época del año, la humedad, la estructura y el pH del suelo (MORILLO y URBANO, 2011).

1.1.4. Métodos de manejo preventivos y control biológico

1.1.4.1. Métodos preventivos

La infección por especies de *Agrobacterium* y particularmente *A. tumefaciens* requiere la participación de la bacteria solo al inicio de la infección, como se sabe, esta posee un mecanismo de colonización genética, una vez que el ADN plasmídico se integre al genoma de la planta e induzca la hiperplasia del tejido vegetal, la aplicación de métodos curativos no tendrá ningún efecto contra la enfermedad, es decir que los métodos de lucha se enfocan hacia la prevención y no al tratamiento. Entre los métodos preventivos se encuentran: el control de calidad sanitaria en plantas y suelos destinados al cultivo, desinfección del suelo por solarización o vapor de agua, desinfección del material vegetal por termoterapia y con agua caliente (MORILLO y URBANO, 2011).

1.1.4.2. Control biológico

El control biológico se lleva a cabo con *A. radiobacter*, esta especie produce bacteriocinas o agrocinas que ejercen un efecto antagónico contra *A. tumefaciens*; actualmente la cepa *A. radiobacter* K84 es la alternativa más eficiente; no obstante, existen otras cepas naturales o genéticamente modificadas que tienen el mismo efecto; para establecer el tipo de control biológico se debe partir del diagnóstico oportuno y preciso del patógeno, mediante un protocolo de caracterización basado en rasgos morfológicos, bioquímicos y moleculares, asegurando la efectividad del tratamiento y evitando así la propagación de enfermedades en cultivos de interés comercial (MORILLO y URBANO, 2011).

1.2. Género *Agrobacterium*

Agrobacterium tumefaciens, al igual que otros microorganismos, es ubicuo y se encuentran de forma natural en el suelo, promoviendo la degradación de la materia orgánica y aprovechando sus nutrientes. No obstante, existen algunas variedades que son patógenos de plantas

dicotiledóneas de interés comercial. Según ESCOBAR y DANDEKAR (2003), entre las especies de *Agrobacterium* patógenas se encuentran: *Agrobacterium rhizogenes* (enfermedad de la raíz peluda), *Agrobacterium rubi* (enfermedad de la agalla de la caña), *Agrobacterium tumefaciens* (enfermedad de la vesícula de la corona) y *Agrobacterium vitis* (agalla de la uva); este género bacteriano aprovecha su maquinaria de transformación genética para transferir sus genes e inducir su expresión en las células vegetales, ocasionando proliferación celular descontrolada e induciendo la síntesis de opinas (LACROIX y CITOVSKY, 2013).

Según ALIPPI et al., (2011) la detección de cepas de *Agrobacterium tumefaciens* es bastante compleja, puesto que existen otros géneros bacterianos del suelo que puede presentar características morfológicas y bioquímicas muy similares, dificultando su caracterización microbiológica y bioquímica. Por otro lado, el éxito de la detección molecular viene determinado por la especificidad de los primers de PCR; además, esta prueba puede tener interferentes de material genético procedente de otras especies que incorporaron un plásmido Ti foráneo, dando origen a falsos positivos; en el caso contrario, una cepa de *A. tumefaciens* que perdió el plásmido Ti dará falsos negativos, sin embargo, cuando emplearon medios de cultivo diferenciales y selectivos, más la combinación de los métodos de detección molecular y pruebas de patogenicidad en tejidos sanos, pudieron determinar la presencia de *A. tumefaciens* con una efectividad del 99%.

1.2.1. Taxonomía del género *Agrobacterium*

Agrobacterium es catalogado como parte de la microbiota natural del suelo. Fue aislado por primera vez por SMITH y TOWNSEND en 1907, y fue catalogado como fitopatógeno inductor de tumores en el cuello o corona de varias especies de plantas dicotiledóneas. Este grupo de bacterias inicialmente se incluían como parte de los rizobios del suelo; sin embargo, debido a que no son fijadores de nitrógeno y son fitopatógenos, se propuso clasificarlos de acuerdo a su capacidad patogénica, basándose en el mecanismo de infección molecular; no obstante, esta clasificación también presentó un problema, debido a que *Agrobacterium* tiene gran capacidad en cuanto a transferencia horizontal de genes, pudiendo encontrarse especies con plásmidos tomados de otros miembros del género. Finalmente se estableció un sistema de clasificación en biotipos, donde las especies *A. tumefaciens*, *A. rhizogenes* y *A. vitis* se corresponderían con los biovars 1, 2 y 3

respectivamente, y a la vez se adoptaría esta clasificación a nivel de especies en función de las características morfológicas, bioquímicas y moleculares (LLOP et al., 2004).

Tabla 1-1: Clasificación taxonómica de *Agrobacterium*.

Categoría	Taxón
Dominio:	Bacteria
Filo:	Proteobacteria
Clase:	Proteobacterias alfa
Orden:	Rhizobiales
Familia:	Rhizobiaceae
Género:	<i>Agrobacterium</i>
Especies/biovars:	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> / Biovar 1 <i>Agrobacterium rhizogenes</i> / Biovar 2 <i>Agrobacterium vitis</i> / Biovar 3

Fuente: BREE, 2015.

Elaborado por: Tandapilco Llumitaxi, Wladimir, 2019

1.2.2. Clasificación del género *Agrobacterium* en biovars

La clasificación de especies del género *Agrobacterium* se basaba en la patogenicidad de sus miembros, pero la facilidad de transferencia horizontal de genes dificultaba su identificación y caracterización; una forma más confiable para agruparlas consistió en identificar las características morfológicas y fisiológicas expresadas por el ADN genómico, dando lugar a tres biovars; donde la mayoría de variantes se identificaban con algún biovar; no obstante, algunas cepas pueden presentar características compartidas, dando lugar a biovars intermedios (BOUZAR *et al.*, 1995). Existen ciertos rasgos bioquímicos comunes para cada biovar, los cuales permiten caracterizar las cepas de *Agrobacterium* bioquímicamente; entre las pruebas más usuales se encuentran la producción de 3-cetolactosa, consumo de tartrato de sodio y potasio, crecimiento a 35 °C y crecimiento en medios salinos, selectivos y diferenciales (SZEGEDI *et al.*, 2005).

Los biovars son grupos de cepas o individuos de una especie que están determinados por genes cromosómicos, presentan características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas que permiten relacionarlas o diferenciarlas entre sí; pudiendo encontrar cepas tumorigénicas, rizogénicas y no patógenas dentro del mismo biovar (LLOP et al., 2004).

Tabla 2-1: Principales características que diferencian las especies del género *Agrobacterium*.

Pruebas	Especies		
	<i>A. tumefaciens</i>	<i>A. rhizogenes</i>	<i>A. vitis</i>
Producción de 3-cetolactosa	+	-	V
Crecimiento en 2 % NaCl	+	-	+
Crecimiento a 35°C	+	V	V
Acción en litmus milk	Alcalina	Ácida	Alcalina
Película en citrato amónico-férrico	+	-	-
Reacción oxidasa	+	V-	V-
Utilización de citrato	V-	+	+
Producción de ácido a partir de:			
Eritritol	-	+	-
Melecitosa	+	-	-
Producción de álcali a partir de:			
Ácido malónico	-	+	+
Ácido L-tartárico	-	+	+
Ácido mícico	-	+	-

+: 80% o más cepas positivo; V: entre el 21-79% de cepas positivas; -: 80% o más cepas negativas

Fuente: (MOORE et al., 2001)

Elaborado por: Tandapilco Llumitaxi, Wladimir, 2019

1.2.2.1. Complejo de *Agrobacterium tumefaciens* o Biovar 1

La mayoría de las cepas de *A. tumefaciens* pertenecen al biovar 1, sin embargo, no se trata de una única especie, sino de un conjunto heterogéneo de 10 especies o genomovares estrechamente relacionadas a nivel cromosómico denominadas como complejo *Agrobacterium tumefaciens*.

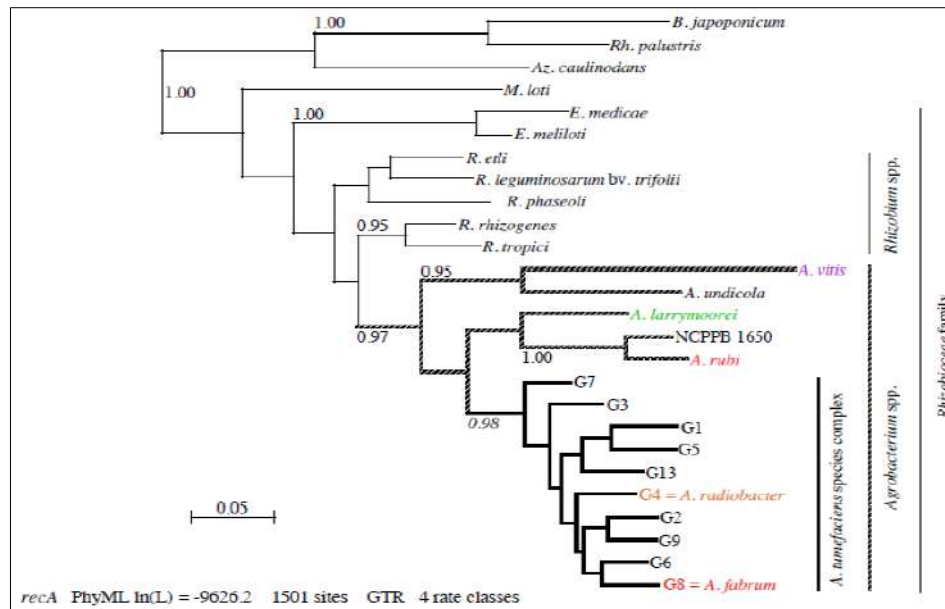


Gráfico 1-1: Nomenclatura de especies del complejo *Agrobacterium tumefaciens*

Fuente: OH, 2014.

1.2.2.2. Plásmido Ti

La generación de tumores en plantas es inducida por la presencia del plásmido Ti (tumor-inducing). El plásmido Ti es el principal portador de los genes de virulencia, posee tamaño entre 150 a 250 Kb, contiene 5 regiones involucradas en la infección, donde se destaca el ADN-T que codifica la secuencia que se integra al ADN de las plantas encargada de la biosíntesis de fitohormonas y opinas, los genes vir que procesan y transmiten el ADN-T, la región de los loci tra y trb encargada de la conjugación bacteriana, la región rep que permite la replicación del plásmido Ti y los genes que promueven la apropiación y el catabolismo de las opinas (LLOP et al. 2004).

1.2.2.3. Opinas

Las opinas son un grupo de moléculas pequeñas cuya estructura está constituida por la condensación de un aminoácido y un cetoácido o un azúcar; se conocen alrededor de treinta tipos distintos de opinas agrupadas en familias. Según GUYON et al., (1980) las opinas desempeñan una función muy importante dentro del mecanismo de infección de *Agrobacterium tumefaciens*, debido a que existe una relación entre el tipo de plásmido y el tipo de opinas que promueven dichos plásmidos; cada especie induce la producción un grupo específico de estas sustancias que

pueden aprovecharlas como fuente de carbono y nitrógeno constituyendo un nicho ecológico favorable para la infección de la planta.

1.3. *Agrobacterium tumefaciens* como herramienta de ingeniería genética

El descubrimiento del mecanismo de infección de *A. tumefaciens*, dio paso al desarrollo de nuevas técnicas de transformación genética. En 1977 se detectaron rastros de ADN bacteriano en tejidos de tabaco, más tarde se confirmarían su presencia en otras especies vegetales, incluso en algunos hongos. Al tratarse de un organismo con capacidad de transferir ADN entre especies diferentes, se da inicio a una serie de aplicaciones en Agrobiotecnología, Biotecnología Ambiental y Biología Molecular, como: transformación genética en plantas, transformación de hongos, modelos de señalización celular, importación nuclear de proteínas y material genético (VALDERRAMA et al., 2005).

La maquinaria de transformación genética de *Agrobacterium* spp., permite incorporar genes de interés foráneos dentro del plásmido Ti, para que sean transmitidos y expresados junto al ADN de distintos organismos como una gran variedad de especies de plantas, levaduras, hongos, e incluso en células humanas. Entre las técnicas más eficientes de transformación bacteriana para *A. tumefaciens* se encuentra la electroporación. Esta emplea una carga eléctrica para dilatar los poros de la membrana plasmática haciendo posible el ingreso de moléculas de ADN extracromosómico (OH, 2014).

1.4. Aislamiento y caracterización de *Agrobacterium tumefaciens*

El aislamiento es una de las técnicas para la detección e identificación de cepas bacterianas en general, *Agrobacterium* se puede aislar desde matrices complejas como tejidos de plantas que presentan sintomatología de la agalla de la corona, de suelo de cultivo, suelo rizosférico y agua de riego; para mayor seguridad se pueden emplear medios diferenciales, selectivos o semi-selectivos con el fin de ejercer presión selectiva sobre los organismos presentes en el medio, dificultando el crecimiento de rizobios, *Pseudomonas* u hongos del suelo y promoviendo el desarrollo de cepas de *Agrobacterium* spp. (ALIPPI et al., 2011).

1.4.1. Medios de cultivo semi-selectivos

Existen medios de cultivo cuya composición permite diferenciar bacterias en base a las características morfológicas que presentan dichas colonias bacterianas, la morfología que presenta una colonia tiene relación con los componentes del medio; una manera de favorecer el desarrollo de un microorganismo en concreto, consiste en enriquecer el medio con sustratos o sales minerales que ejerzan presión selectiva, entre las fuentes de carbono selectivas para especies de *Agrobacterium* se encuentran las opinas, citrato, manitol, arabitól, entre otras; respecto a las sales se tiene el selenito de sodio y el telurito de potasio, ambas muy tóxicas para especies ajenas al género *Agrobacterium*. La selectividad del medio D1 está impuesta por la alteración en la estructura de la membrana y la pared celular; además, este medio se desarrolló específicamente para bacterias patógenas de plantas, en su formulación se tiene componentes activos como el cloruro de litio, que afecta la permeabilidad de la membrana bacteriana restringiendo el crecimiento de otros microbios, mientras permite el desarrollo de *Agrobacterium* spp. (KADO y HESKETT, 1970).

Las colonias aisladas de medios selectivos deben purificarse previo a su análisis posterior, debido a que pueden transferir ciertos compuestos químicos que interfieren con la identificación; tal es el caso de colonias de color negro, procedentes de medios suplementados con telurito de potasio, el color puede confundir la interpretación de las pruebas bioquímicas que se realicen (FINER et al., 2016). Por lo tanto, los aislamientos obtenidos se deben repicar en placas con medio de mantenimiento para fines de purificación. Según lo recomendado por SHAMS et al., (2012) cada colonia debe purificarse al menos dos veces para obtener una cepa bacteriana pura.

1.4.2. Caracterización morfológica bacteriana

La morfología de colonias bacterianas permite asignar una identidad aproximada, también facilita la elección de pruebas bioquímicas, tomando en cuenta sus rasgos morfológicos macroscópicos y microscópicos que presentan las colonias originadas a partir de un cultivo puro. La morfología y fisiología que presentan los microorganismos son resultado del metabolismo celular y la naturaleza de las estructuras celulares, de modo que el sustrato interviene directamente en las propiedades que presenta una colonia en particular (BERRÍOS y LLABACA, 2018).

1.4.2.1. Morfología macroscópica de colonias

Las características morfológicas macroscópicas se estudian en poblaciones bacterianas visibles, originadas sobre medio solido a partir de una única bacteria, denominadas colonias, aisladas de un cultivo microbiano, en función de rasgos como su color, tamaño, elevación, margen, superficie, forma, y comportamiento ante la luz. Estas características varían de acuerdo a la especie microbiana, a la naturaleza del sustrato, al pH del medio, al contenido de salinidad, a la edad del cultivo y propiedades que ejercen presión selectiva sobre la carga microbiana presente en la muestra (BERRÍOS y LLABACA, 2018).

Criterios morfológicos de caracterización macroscópica:

- Forma: circular, irregular, rizoide, puntiforme, fusiforme, filamentosa.
- Borde: Entero, ondulado, lobulado, filamentoso, dentado.
- Elevación de la colonia: plana, levantada, convexa, cóncava, pulvinada, umbilicada.
- Superficie: lisa, rugosa, escamosa.
- Coloración: colorida, incolora.
- Consistencia: cremosa, membranosa, viscosa.
- Luz transmitida: opaca, translúcida, transparente.
- Luz reflejada: opaca, brillante.

1.4.2.2. Morfología microscópica mediante aplicación de Tinción Gram

La tinción diferencial de Gram permite clasificar a las bacterias en Gram positivas y Gram negativas; su fundamento se basa en la composición y las características de la pared celular bacteriana como el contenido de peptidoglucano y la afinidad de ciertos colorantes por tales estructuras; las bacterias Gram negativas poseen membrana celular externa y pared celular conformada por una delgada capa de peptidoglucano, mientras, que las bacterias Gram positivas cuentan con una gruesa pared celular de peptidoglucano dispuesto en capas sucesivas pero no poseen membrana externa; el cristal violeta se usa como colorante primario, debido a su gran afinidad con el peptidoglucano; con la adición del lugol se promueve la formación del complejo cristal violeta-yodo que evita la fuga del cristal violeta al medio, saturando los espacios entre las capas de peptidoglucano. Luego, con la adición de una solución de alcohol-acetona se destruye la membrana celular externa de las bacterias Gram negativas y se deshidrata la pared celular; a diferencia de las bacterias Gram negativas, las Gram positivas tiene una muy buena capacidad de retención del complejo cristal violeta-yodo. La safranina actúa como un colorante de contraste, tiñendo las células bacterianas del proceso anterior que fueron incapaces de retener el complejo cristal violeta-yodo. Al finalizar el proceso las bacterias Gram positivas presentan color azul oscuro a morado, mientras que las Gram negativas presentan color rosa a rojo bajo el microscopio (LÓPEZ et al., 2014).

De acuerdo a CULTIMED, (2002) es recomendable realizar la prueba en cultivos jóvenes debido a que las cultivos viejos reducen su afinidad por los colorantes, de igual forma el rompimiento de la pared celular hace variar su coloración.

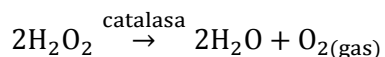
1.4.3. Pruebas de caracterización bioquímicas

La gran variedad de características bioquímicas que presentan los microorganismos son consecuencia directa de su diversidad genética; por ende, las características que presentan un determinado género o cepa microbiana son resultados de la interacción bioquímica de los componentes estructurales de la célula (PRESCOTT *et al.*, 2002). El metabolismo va cambiando a medida que se desarrolla el cultivo; las enzimas y productos metabólicos son específicos para cada etapa de crecimiento y también dependen del sustrato empleado, por tal razón existen

pruebas de lectura inmediata y de lectura lenta. Esto permite clasificar a los microorganismos de acuerdo a un criterio bioquímico mediante la aplicación de colorantes, sales metálicas, modificación de salinidad y pH o variaciones de temperatura en la incubación; las pruebas bioquímicas más comunes son: prueba de la catalasa, prueba de la oxidasa, identificación de azúcares reductores (MADIGAN *et al.*, 2009).

1.4.3.1. Producción de catalasa

La prueba de producción de catalasa es parte de la caracterización inicial en la mayoría de las bacterias; se trata de una enzima antioxidante presente en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contienen citocromo, actúa detoxificando la célula del peróxido de hidrógeno formado durante la respiración celular oxidativa. La catalasa hidroliza el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular, resultando en la liberación de burbujas de gas (FERNÁNDEZ *et al.* 2010; CERVERA, 2011).



1.4.3.2. Producción de oxidasa

La prueba de producción de citocromo-oxidasa es indispensable en la caracterización inicial de bacterias Gram negativas; su actividad se restringe a bacterias aerobias y algunas anaerobias facultativas. La enzima citocromo-oxidasa forma parte del metabolismo de los nitratos y de la cadena de transporte de electrones con el oxígeno como aceptor final, el citocromo se oxida y es reducido por acción del oxígeno molecular produciendo agua o peróxido de hidrógeno. En presencia de oxígeno atmosférico la enzima citocromo-oxidasa acepta electrones de sustratos artificiales, oxida un derivado de la fenilendiamina formando indofenol, un producto de color púrpura oscuro (FERNÁNDEZ *et al.* 2010).

1.4.3.3. Aclaramiento ácido en PDA-CaCO₃

La producción de ácido a partir de glucosa es característica de *Agrobacterium biovar 2*, pese a que los dos biovars restantes también pueden producir ácido, estas lo hacen en muy pequeñas cantidades, la prueba permite diferenciar entre cepas de biovar 2 de los demás biovars, mediante la formación de un halo o anillo de aclaramiento ácido en placas de PDA suplementado con CaCO₃ (BOUZAR y JONES, 1992).

1.4.3.4. Prueba SIM

La prueba de sulfuro-indol-motilidad requiere del medio semisólido SIM, formulado a base de una mezcla de peptonas. El sulfuro de hidrogeno se produce por la liberación del azufre de ciertos aminoácidos y sales del medio, el desarrollo de color negro que aparece en la línea de siembra determina su presencia; por otro lado, el indol es un producto del metabolismo bacteriano del triptófano, su producción es fácilmente detectable, cuando se combina con ciertos aldehídos produce coloración rojiza del medio, para revelar la producción de indol se añade unas gotas de reactivo de Erlich o reactivo de Kovacs; mientras tanto, la motilidad se determina por la turbidez generada por el crecimiento bacteriano fuera de la línea de siembra (CULTIMED, 2002; FERNÁNDEZ et al., 2014).

1.4.3.5. Capacidad de crecimiento en telurito de potasio

El telurito de potasio restringe el crecimiento de bacterias ajenas al género *Agrobacterium*, actúa como un factor que ejerce presión selectiva sobre medios de cultivo, además, permite diferenciar las colonias de *Agrobacterium* spp. de algunas otras bacterias que también toleran la sal de telurito; particularmente colonias de *Agrobacterium tumefaciens* presentan una coloración negra brillante o metálica, circulares, convexas y de borde entero, la coloración se debe a que las células acumulan en su interior el telurito metálico cristalizado (MOUGEL et al., 2001).

1.4.3.6. Producción de 3-cetolactosa

La capacidad de oxidar enzimáticamente el tercer carbono del resto glucosilo derivado del metabolismo de disacáridos (maltosa, lactosa y sacarosa) y ácidos biónicos produciendo 3-cetoglucosidos es propiamente atribuida al complejo *Agrobacterium tumefaciens*; particularmente, la lactosa se oxida a 3-cetolactosa, este compuesto a diferencia de los demás 3-cetoglucosidos no se consume y tiende a acumularse en el medio; la 3-cetolactosa reduce rápidamente el Cu^{2+} del reactivo de Benedict a Cu^{+} produciendo Cu_2O , la reacción ocurre a temperatura ambiente permitiendo visualizar la formación de un anillo naranja-rojizo al cabo de 1-2 horas de incubación (ALIPPI et al., 2011; DAVOODI y HAJIVAND, 2013; TOLBA y SOLIMAN, 2014) citando la técnica desarrollada por (BERNAERTS y DE LEY, 1963).

1.4.4. Caracterización molecular de Agrobacterium tumefaciens

El estudio del genoma bacteriano inicialmente giraba en torno al ADN cromosómico; algunas especies de *Agrobacterium* poseen además un cromosoma lineal y uno o dos plásmidos, denominado plásmido Ti o plásmido inductor de tumores, con un tamaño entre 200 y 800 kpb. Dentro del plásmido existen genes de virulencia, mismos que por su naturaleza pueden transferirse entre especies distintas, lo que le permite infectar plantas, usándose habitualmente en transformación genética (LLOP et al., 2004).

1.4.4.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa permite que la cadena de ADN se separe en sus dos hebras, gracias a la reacción continua de una solución con taq-polimerasa, nucleótidos y primers específicos que se posicionan en los extremos del segmento que se requiera amplificar. Esto da lugar a la síntesis de una cadena complementaria, cuyo proceso ocurre dentro de un termociclador que es sometido a variaciones de temperatura y donde la concentración de ADN se duplica en cada ciclo (VOET et al., 2007). El termociclador permite simular in vitro las condiciones requeridas para la replicación del ADN que ocurre dentro de las células, en su interior se realizan ciclos alternados de incremento y disminución de temperatura, el proceso se compone de tres etapas, la primera consiste en la desnaturalización del ADN al incrementar la temperatura a 95°C por un

tiempo necesario para romper los puentes de hidrogeno y separar las hebras de ADN, la segunda etapa consiste en la hibridación del ADN, en esta etapa los primers se adhieren a la secuencia complementaria de ADN diana, flanqueando la secuencia a amplificar, la temperatura de alineación se encuentra en 45 – 65 °C y viene determinada por los primers; la tercera etapa se denomina amplificación y ocurre a una temperatura optima de 72°C y consiste en adicionar nucleótidos y extender la cadena de ADN; mediante este proceso se puede incrementar exponencialmente la concentración de material genético de interés, tras haberse completado 35 ciclos (BOLIVAR et.al., 2014).

1.4.4.2. PCR multiplex (mPCR)

La PCR múltiple (mPCR) permite la amplificación simultánea de dos o más fragmentos de ADN ya sea que las regiones diana pertenezca al genoma de un mismo organismo o al organismo distinto, con la consideración que dichas regiones deben ser lo suficientemente diferenciadas para evitar la amplificación de productos inespecíficos; la reacción tiene lugar dentro de un mismo tubo de reacción, por ende es necesario estandarizar el protocolo de PCR tomando en cuenta las temperaturas de reacción y los componentes de la master mix, a fin de promover la síntesis de productos deseados y reducir los productos inespecíficos resultado de amplificaciones preferenciales; la mPCR requiere de menor cantidad de reactivos, templado de ADN y hace posible la amplificación simultanea de secuencias diana reduciendo el tiempo de diagnóstico, es una herramienta útil en análisis de mutaciones, polimorfismos, microsatélites, detección de organismos modificados genéticamente, diagnóstico de patógenos y caracterización para asignación filogenética (BOLIVAR et al., 2014).

1.4.4.3. Electroforesis en gel de agarosa

La técnica de electroforesis permite separar ADN por tamaños. Los fragmentos de ADN migran a diferente velocidad a través de los poros del gel de agarosa y los pedazos de ADN, cuya carga es negativa, son atraídos hacia el ánodo al otro extremo de la cubeta de electroforesis. Para el revelado de las bandas se emplea bromuro de etidio y se observa con la ayuda de una cámara con luz UV (BROWN et al., 2008). Una vez transcurrido el tiempo de separación por electroforesis se espera que las moléculas de ADN hayan migrado hacia el ánodo conformando agrupaciones en

función de su tamaño, para el revelado de estas agrupaciones o bandas se añade un colorante específico como el bromuro de etidio que permite visualizar las bandas de ADN mediante un transiluminador ultravioleta.

1.4.4.4. Secuenciación de amplicón del ADNr 16S

El gen *rrs* que codifica para el ARNr 16S de los procariotas posee regiones altamente conservadas, lo que permite la clasificación taxonómica mediante el análisis filogenético de las secuencia amplificada con primers universales 27F y 1492R, la secuenciación permite conocer el orden en el cual se encuentran dispuestos los nucleótidos del amplicón, para este fin existen métodos químicos y enzimáticos que permiten cortar el ADN en sitios específicos, una vez obtenida la secuencia de nucleótidos se realiza un análisis bioinformático donde se establece su similitud con secuencias de otros microorganismos depositadas en las bases de datos de secuencias, el microorganismo generalmente se identifica a nivel de género, en algunos casos se puede establecer la filogenia a nivel de especie (RODICIO y MENDOZA, 2004).

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

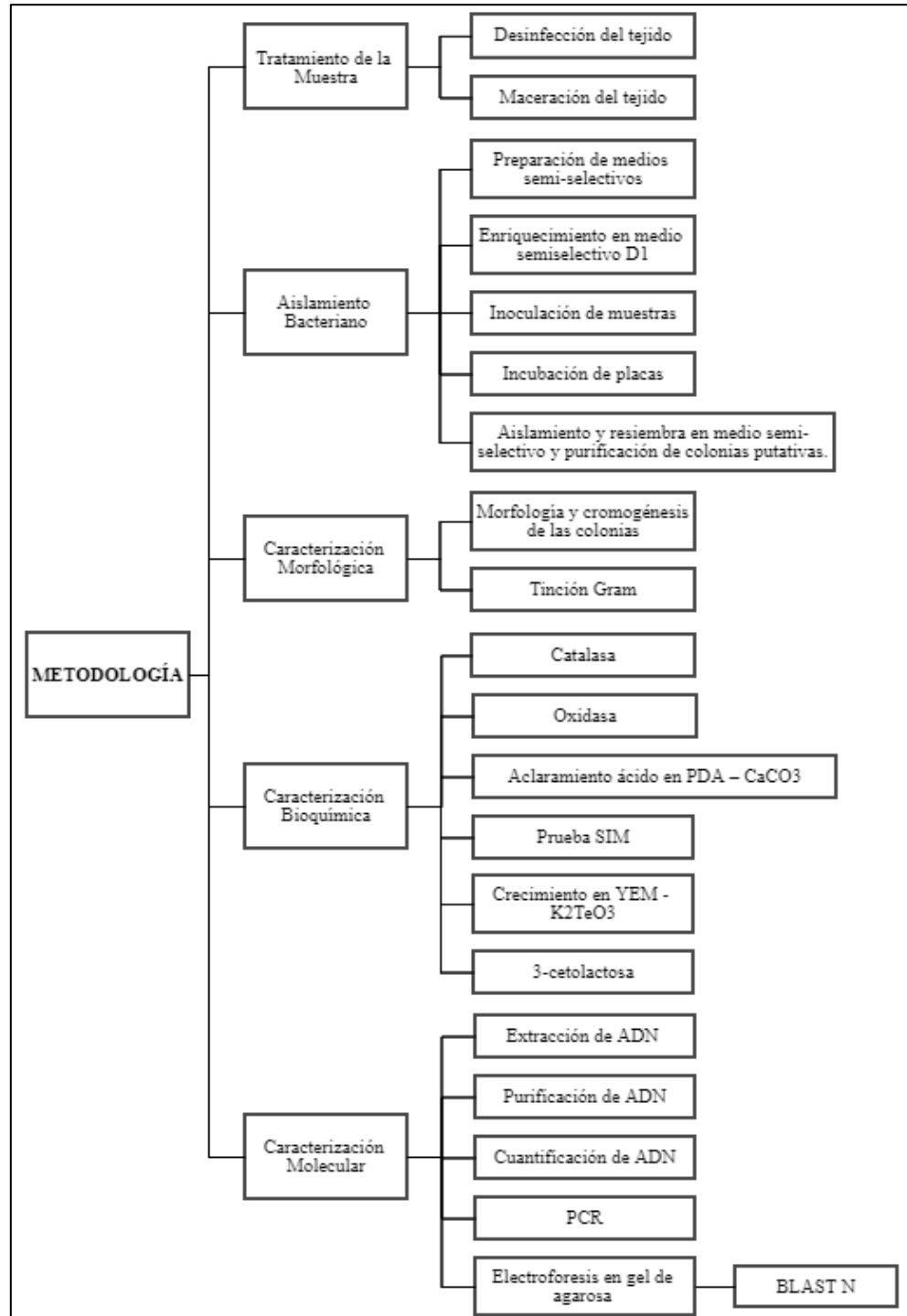


Gráfico 1-2: Diagrama de las etapas de la investigación.

Elaborado por: Tandapilco Llunitaxi, Wladimir, 2019

2.1. Lugar del desarrollo de la investigación

El desarrollo del presente trabajo de investigación se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Identificación Molecular IDgen, ubicado en Av. de los Granados E14-285 y Eloy Alfaro, 170503, Quito, con coordenadas geográficas UTM WGS 84 17S, latitud 0°9'56.95"S y longitud 78°28'6.94"O; a una altura de 2825 m.s.n.m.

2.2. Materiales y equipos

Los reactivos y equipos fueron proporcionados por el Laboratorio de Identificación Molecular IDgen; los reactivos no disponibles se adquirieron de la bodega de la facultad de ciencias de la ESPOCH y se financiaron por cuenta propia.

2.3. Tipo y Diseño de Investigación

2.3.1. Por el tipo de investigación

La investigación es aplicada debido a que busca un fin específico e inmediato, el cual consiste en aislar y caracterizar *Agrobacterium tumefaciens* mediante el uso de medios de cultivo semi-selectivos compuestos, con selectividad basada en tolerancia a la toxicidad de sales metálicas y afinidad por fuentes de carbono y nitrógeno para su posterior caracterización microbiológica, bioquímica y molecular.

2.3.2. Por el diseño de investigación

Investigación no experimental.

2.4. Unidad de análisis

Tejidos tumorales de rosas comerciales de la colección de muestras almacenadas en el Laboratorio de Identificación Molecular IDgen.

2.5. Población de estudio

Colección de muestras de rosas comerciales almacenadas en el Laboratorio de Identificación Molecular IDgen.

2.6. Etapas de la investigación

2.6.1. Tratamiento de la muestra

2.6.1.1. Desinfección del tejido

Las agallas se lavan con agua potable y jabón líquido frotando ligeramente por 5 minutos, para eliminar el suelo que pudiera estar adherido a la muestra, se enjuagan y se secan con toallas de papel. Se desinfecta la superficie de las agallas sumergiéndolas durante 2 a 15 minutos en una solución de hipoclorito de sodio de 0.5 al 1%, de acuerdo a ISLAM et al., (2013) el tiempo de esterilización viene determinado por el tipo y concentración del desinfectante usado así como por naturaleza del tumor. Finalmente, se enjuaga al menos en tres ocasiones por 5 minutos en agua destilada estéril y se deja secar sobre papel filtro estéril (RHOUMA et al., 2006; ALIPPI et al., 2011; DAVOODI y HAJIVAND, 2013; TOLBA y SOLIMAN, 2014).

2.6.1.2. Maceración del tejido

Se extrae la superficie de las agallas con bisturí estéril y se toman 0.5 gramos de tejido a partir de 3 submuestras de distintas partes del tejido tumoral interno; esto se dispensó directamente en 500 µl de agua destilada estéril contenidos en microtubos eppendorf de 1.5 o 2 ml con perlas de vidrio para su trituration empleando BeadBeater. Para una óptima difusión celular en la solución es

indispensable dejar macerar por al menos 30 minutos, tiempo requerido para lograr una separación celular eficiente de los polisacáridos producidos por *Agrobacterium* (SHAMS et al., 2012). Finalmente se vertió el contenido de los microtubos a un tubo de ensayo estéril con 5 ml de agua destilada estéril y se dejó incubar a 28 °C durante toda la noche (ISLAM et al., 2013).

2.6.2. Aislamiento bacteriano

2.6.2.1. Preparación de medios de cultivo semiselectivos

Tabla 1-2: Medio de cultivo semiselectivo D1.

Sustancia	Contenido en gramos por litro (g/l)
Manitol	15
NaNO ₃	5
LiCl	6
Ca(NO ₃) ₂ *4H ₂ O	0.02
Azul de bromotimol	0.1
K ₂ HPO ₄	2
MgSO ₄ *7H ₂ O	0.2
Agar	15

Realizado por: Tandapilco Llumitaxi, Wladimir, 2019

Composición descrita por (ALIPPI et al., 2011; OH, 2014) de acuerdo a la formulación propuesta por KADO y HESKETT (1970). Según ALIPPI et al., (2011) se puede mejorar la selectividad suplementando 60 µg/ml de K₂TeO₃.

- Aforar a 1 litro con H₂O destilada y esterilizar en autoclave a 121 °C a 15 psi durante 15 min.
- Preparar una solución de cicloheximida al 2% y esterilizar por filtración con un filtro de membrana de 0.2 µm.
- Dejar enfriar el medio hasta aproximadamente 50 – 55 °C, verificar que presente un color azul oscuro y pH alrededor de 7,2 antes de suplementar 20 ml cicloheximida al 2% (20mg/ml).

- Verter de 10 a 15 ml del medio en placas de petri estériles y dejar secar en cámara de flujo laminar, sellar y almacenar en un refrigerador a 4°C.

Tabla 2-2: Medio de cultivo sólido a base de sales AT.

Solución	Sustancia	Contenido en gramos por litro (g/l)
20x sales AT	(NH ₄) ₂ SO ₄	40
	MgSO ₄ *7H ₂ O	3.2
	CaCl ₂ *2H ₂ O	0.2
	MnSO ₄ *H ₂ O	0.024
20x buffer AT (el pH se ajusta a 7 con NaOH)	KH ₂ PO ₄	214
	NaOH	35
Glucosa al 50%	C ₆ H ₁₂ O ₆	500
50x stock de hierro	FeSO ₄ *7H ₂ O	34.75
Agar de sales AT	Agar	15

Realizado por: Tandapilco Llumitaxi, Wladimir, 2019

Composición descrita por (MORTON y FUQUA, 2012; XU et al., 2013; WETZEL et al., 2014) de acuerdo a la formulación propuesta por (TEMPÉ et al., 1977). Según MORTON y FUQUA, (2012) es un medio estándar definido para el crecimiento y, por lo tanto, es menos probable que produzca el desarrollo de mutantes auxotróficos. Se suplemento con manitol o glucosa al 0.2% como fuente de carbono (WETZEL et al., 2014).

- Preparar la solución de sales AT, solución buffer AT, el stock de hierro, la solución de fuente de carbono.
- Agregar 50 ml de 20x sales AT, 50 de 20x buffer AT, 10 ml de Glucosa al 50%, 20 ml de 50x stock de hierro y 15 g de agar, aforar a 1 litro con H₂O destilada y esterilizar en autoclave a 121 °C a 15 psi durante 15 min.
- Dejar enfriar a 55°C y verter 15 ml de medio en placas de petri estériles, secar en cámara de flujo laminar, sellar y almacenar en un refrigerador a 4 °C.

2.6.2.2. Enriquecimiento en medio semiselectivo D1

Se prepara caldo D1 suplementado con cicloheximida y se dispensa 4.5 ml en cada tubo, se adiciona 500 µl del macerado, se etiqueta y se deja incubar por 72 horas a 28 °C.

2.6.2.3. Inoculación de muestras

Se toma un asa bacteriológica estéril y se sumerge en la suspensión, esperando tomar aproximadamente 25 µl del macerado, y se siembra directamente sobre las placas de medio de cultivo selectivo sólido utilizando la técnica de estría cruzada. Se sellan las placas con cinta parafilm y se etiqueta de acuerdo al código de la muestra y medio selectivo (SHAMS et al., 2012; BREE, 2015).

2.6.2.4. Incubación de placas

Las placas deben incubarse a 28 °C; en caso de usar medios modificados con telurito de potasio, las colonias tardarán en aparecer entre 3 a 4 días debido a que este componente tiende a ralentizar el crecimiento; además, no todas las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* se desarrollan a la misma velocidad, por lo tanto se debe seleccionar colonias discretas cada 24 horas (SHAMS et al., 2012).

2.6.2.5. Aislamiento y resiembra en medio semiselectivo y purificación de colonias.

Tabla 3-2: Medio de cultivo LB para mantenimiento.

Sustancia	Contenido en gramos por litro (g/l)
Extracto de levadura	5
Peptona de caseína	10
NaCl	5
Agar-Agar	15

Realizado por: Tandapilco Llunitaxi, Wladimir, 2019

Se toma la colonia más representativa con morfología esperada para *Agrobacterium tumefaciens*, se transfiere al medio agar Luria Bertani (LB) mediante la técnica de estría cruzada y posterior repique con palillos de dientes en cuadrícula de 2 cm², para mantenimiento de cepas de trabajo, se pueden depositar hasta 4 cepas por placa. La técnica de repiques disminuye la posibilidad de transferir células y nutrientes en exceso durante la purificación clonal; además, a diferencia del rayado se evita la sobreposición de colonias, se requiere purificar los clones mediante repiques posteriores (OH, 2014).

Para la purificación se deben tomar colonias que presentan morfología típica de *Agrobacterium tumefaciens* y suspender en 100 µl de agua destilada estéril, se rehidratan dejando en agitación durante la noche a 28°C, luego se raya en medios de mantenimiento libre de telurito de potasio u otros componentes del medio selectivo que pueden interferir en la caracterización posterior; para introducir un nuevo aislamiento en la colección del laboratorio se requiere al menos una tercera etapa de purificación, siguiendo el proceso indicado anteriormente (SHAMS et al., 2012).

2.6.3. Caracterización morfológica

Las colonias originadas a partir de un cultivo puro se agrupan de acuerdo a las características, ya sea visibles a simple vista o con ayuda de un microscopio y se reportan como colonias putativas de *Agrobacterium tumefaciens* si presentan características como las proporcionadas en bibliografía. Para el análisis posterior, se tomaron cultivos puros del centro de los aislamientos para evitar cualquier reacción cruzada que pudiera resultar en falsos positivos o negativos.

2.6.3.1. Morfología y cromogénesis de las colonias

Las colonias aisladas en medio solido se describen y agrupan mediante el siguiente conjunto de criterios fenotípicos:

- Forma: circular, irregular, rizoide, puntiforme, fusiforme, filamentosa.
- Borde: Entero, ondulado, lobulado, filamentoso, dentado.

- Elevación de la colonia: plana, levantada, convexa, cóncava, pulvinada, umbilicada.
- Superficie: lisa, rugosa, escamosa.
- Coloración: colorida, incolora.
- Consistencia: cremosa, membranosa, viscosa.
- Luz transmitida: opaca, translúcida, transparente.
- Luz reflejada: opaca, brillante.

2.6.3.2. Tinción Gram

Las bacterias contenidas en las placas petri se activaron a 35°C, se toma una colonia del medio empleando un asa bacteriológica y se extiende en la superficie del portaobjetos humedeciendo con una gota de agua destilada, para fijar la muestra se pasa el frotis por la flama de un mechero hasta que quede completamente seco. Luego se añade cristal violeta y se deja actuar durante 1 minuto, se enjuaga con agua destilada y se añade lugol durante 1 minuto, se enjuaga por segunda ocasión, se agrega la solución de alcohol-acetona durante 1 minuto, se enjuaga por tercera ocasión, se añade safranina y se deja actuar durante 1 a 2 minutos, por último, se enjuaga y se seca cerca de la flama. Se añade una gota de aceite de inmersión y se observa en el microscopio con el objetivo de 100X. Si las células bacterianas presentan color azul oscuro a morado se reportan como Gram positivas (+), mientras que si presentan color rojo a rosa se reportan como Gram negativas (-); además con la observación se puede determinar forma, tamaño y disposición celular (MORENO y VELARDE, 2016).

2.6.4. Caracterización bioquímica

2.6.4.1. Catalasa

Tomar parte del centro de una colonia aislada con un palillo de dientes estéril, depositar la colonia y extender en la superficie del portaobjetos, desechar el palillo de dientes para su esterilización, luego añadir de una a dos gotas de peróxido de hidrogeno al 3% y dejar actuar durante 10 a 30 segundos. Si la colonia presenta efervescencia transcurrido 20 segundos se

reporta como catalasa positiva (+), mientras que si transcurrido los 20 segundos presenta nula o muy escasa efervescencia se reporta como catalasa negativa (-); se trabaja cerca del mechero para evitar contaminación, no reportar resultados después de 30 segundos para evitar falsos positivos debido a la acción de otras enzimas, se debe realizar la prueba con células viables de 24 horas de incubación para evitar falsos negativos, tampoco se debe homogenizar la mezcla ni colocar la colonia sobre el peróxido directamente (FERNÁNDEZ et al., 2010).

2.6.4.2. *Oxidasa*

Tomar parte del centro de una colonia aislada con un palillo de dientes estéril, depositar la colonia y extender en la superficie reactiva de la tira de oxidasa, desechar el palillo de dientes para su esterilización. Esperar 10 a 30 segundos, si la tira se tiñe de azul a violeta azulado reportar como oxidasa positiva (+), mientras que si la tira se tiñe de rosa o no vira de color se reporta como oxidasa negativa (-). Para evitar falsos positivos no se debe reportar resultados después de 30 segundos, para evitar falsos negativos hay que realizar la prueba con células viables de 24 horas de incubación, y no se debe usar colonias provenientes de medios con alto contenido de azúcares, colorantes o con pH ácido (FERNÁNDEZ et al., 2010).

2.6.4.3. *Aclaramiento ácido en PDA – CaCO₃*

Preparar medio PDA de acuerdo a las instrucciones del fabricante, suplementar con CaCO₃ al 0,05 %; esterilizar en autoclave 15 psi y 121 °C durante 15 minutos, se deja enfriar el medio hasta aproximadamente 50 – 55 °C, mantener en agitación para evitar que el CaCO₃ precipite, verter de 10 a 15 ml del medio en placas de petri estériles y dejar solidificar en cámara de flujo laminar, sellar y almacenar en un refrigerador a 4°C para su uso posterior; las placas de PDA-CaCO₃ deben presentar un color blanquecino. El ensayo se puede llevar a cabo mediante la técnica de estría cruzada o bien mediante repique en cuadrícula con palillos de dientes, transfiriendo un inóculo del centro de la colonia de interés. Finalmente se deja en incubación a 28 °C por 24 horas y se inspecciona las placas, si se encuentran colonias convexas, circulares enteras de color blanco a beige, rodeadas por un halo de aclaramiento se reportan como PDA-CaCO₃ positivas (+); si las colonias presentan la morfología antes mencionada, pero sin la presencia del halo de aclaramiento se reportan como PDA-CaCO₃ negativas (-). De resultar

difícil la apreciación de la zona de aclaramiento ácido en PDA suplementado con carbonato de calcio a 0.5 g/L se recomienda incrementar su concentración a 0.8 g/L y incubarlo durante 48 horas.

2.6.4.4. Prueba SIM

Preparar el medio SIM siguiendo las instrucciones del fabricante, calentar hasta disolver y dispensar 5 a 8 ml del medio en cada tubo, esterilizar a 121 °C, a 15 psi durante 15 minutos, se deja solidificar en posición vertical. Para esta prueba se emplea un asa recta con la que se toma un inóculo del centro de una colonia purificada y aislada, el asa se introduce en el centro del tubo a 2/3 de profundidad, se debe extraer el asa cuidadosamente siguiendo la misma línea de picadura. Los tubos se incuban por un periodo de 24 a 48 horas, para la prueba de motilidad se recomienda incubarlo 2 tubos con el mismo inóculo, a dos diferentes temperaturas (28°C y 35 °C) debido a que la temperatura óptima de crecimiento puede restringir la movilidad. Se trabaja cerca del mechero, se esteriliza el asa después de cada inoculación, se flamea la boca del tubo de ensayo antes y después de la inoculación. Transcurrido el periodo de incubación se reportan los resultados, para la producción de H₂S: si el medio de cultivo presenta ennegrecimiento se reportará como sulfuro positivo (+), mientras que si el medio de cultivo permanece incoloro se reportará como sulfuro negativo (-), para el ensayo de motilidad: si hay crecimiento fuera de la línea de siembra se reportará como motilidad positiva (+), mientras que si hay crecimiento únicamente en la línea de siembra se reportará como motilidad negativa (-).

2.6.4.5. Crecimiento en YEM - K₂TeO₃

Preparar medio YEM (extracto de levadura-manitol) de acuerdo a las instrucciones del fabricante, esterilizar a 121 °C, a 15 psi durante 15 minutos, se deja enfriar el medio hasta aproximadamente 50 – 55 °C, se verifica que presente un pH 6.8 +/- 0.2 antes de suplementar cicloheximida al 2% (20mg/ml) y telurito de potasio a 60 ppm. Una vez suplementado se vierte de 10 a 15 ml del medio en placas de petri estériles y se dejan secar en cámara de flujo laminar, se sellan y almacenan en un refrigerador a 4°C por 24 horas o hasta su uso posterior. Con un asa estéril se toma un inóculo del centro de colonias aisladas en PDA-CaCO₃, se siembra por estriado en el medio sólido YEM-K₂TeO₃, las placas se incuban a 28 °C por 48 horas. Finalmente se

inspeccionan las placas, si se encuentran colonias convexas, circulares de borde entero y color negro metálico se reporta como: K_2TeO_3 positivas (+); si las colonias no presentan los rasgos morfológicos antes mencionados se reporta como K_2TeO_3 negativas (-).

2.6.4.6. 3-cetolactosa

Preparar el medio de lactosa, esterilizar en autoclave a 121 °C, a 15 psi durante 15 minutos, se deja enfriar a 55 °C y se verifica que el pH del medio se encuentre entre 6 y 7, luego se dispensa en cajas petri y se espera a que solidifique. Dividir el área de cada caja en cuadrículas de 2 cm² con rotulador o usar una plantilla de papel con las mismas dimensiones, en el centro de cada cuadrícula se deposita un inóculo con un palillo de dientes o con un asa de inoculación estéril y se dispersa con movimientos circulares formando manchas con un diámetro aproximado de 0.5 cm, las cuadrículas se etiquetan de acuerdo al código de la cepa que fue inoculada. Las cajas se incuban a 28 °C, durante 48 horas. Transcurrido dos a tres días de incubación se debe cubrir parcial o completamente la caja petri con 1 a 5 ml de reactivo de Benedict, se deja actuar durante 2 horas. Finalmente se reporta los resultados para la prueba de producción de 3-cetolactosa de la siguiente manera; si se forma un anillo amarillo se reporta como 3-cetolactosa positiva (+), mientras que si no forma un anillo se reporta como 3-cetolactosa negativa (-).

Tabla 4-2: Medio de cultivo para verificar la producción de 3-cetolactosa.

Sustancia	Contenido en gramos por litro (g/l)
Lactosa	10
Extracto de levadura	1
Agar	20

Fuente: (MOORE et al., 2001)

Realizado por: Tandapilco Llumitaxi, Wladimir, 2019

2.6.5. Caracterización molecular

2.6.5.1. Extracción de ADN

Tomar aproximadamente 50 mg de masa bacteriana en un tubo eppendorf estéril de 1.5 ml con 3 perlas de vidrio; se adiciona 500 µl de buffer de extracción (2.5% p/v CTAB; 1.4 M NaCl; 20 mM EDTA; 100 mM Tris-HCl, pH: 8) y 2 µl de β-mercaptoetanol. Pulverizar la muestra con mini BeadBeater dos veces a velocidad máxima para asegurar un buen triturado o lisis mecánica, se incuba por 30 minutos a 60 °C en baño maría, homogenizar el contenido del tubo invirtiendo cada 10 minutos. Se añade 500 µl de cloroformo frío y se homogeniza en Vortex durante 30 segundos, luego se deja en reposo por unos minutos. Posteriormente se centrifuga los tubos a 14.600 rcf durante 15 a 20 minutos, se debe verificar formación de una interface visiblemente marcada, lo que indica una óptima separación de fases, se toma una alícuota de aproximadamente 400 µl del sobrenadante cuidadosamente evitando mezclar las fases, la alícuota se transfiere a un micro tubo estéril de 1.5 ml y se adiciona un volumen de etanol absoluto frío equivalente al volumen de sobrenadante obtenido, 150 µl de acetato de sodio 3M y 300 µl de etanol frío al 70% filtrado para dar paso a la precipitación del ADN y se deja a -20 °C durante toda la noche. Centrifugar la muestra a 14.600 rcf por 11 a 17 minutos, se verifica la formación del pellet al fondo del tubo para proceder a descartar el sobrenadante, si no se ve la precipitación del pellet se elimina cuidadosamente el sobrenadante, se conserva la fase densa que contiene el ADN a purificar. Realizar dos lavados al pellet con una alícuota de 200 µl de etanol al 70% y eliminar por inversión, se deja secar el pellet en la cámara de flujo laminar durante 15 a 20 minutos. Por último, se resuspende el pellet con 25 µl de agua DEPC, se adiciona 1 µl de RNasa y se incuba a 37 °C por 30 minutos, se cuantificar el ADN y almacenar las muestras a -20 °C para su amplificación posterior.

2.6.5.2. Purificación de ADN

El tubo con ADN que no precipitó se purifico con un kit, siguiendo las instrucciones del fabricante para el protocolo de purificado de ADN a partir de geles usando una centrifuga del *kit PureLink™ Quick Gel Extraction & PCR Purification Combo Kit K220001* de invitrogen.

2.6.5.3. Cuantificación de ADN

Se conecta el espectrofotómetro UV visible NanoDrop 2000 a la fuente de energía y al computador, se ejecuta el programa NanoDrop 2000 y se elige la opción ácidos nucleicos. Se empieza por limpiar el pedestal con etanol al 70% y secar con papel liso para limpieza de lentes, este procediendo se realiza por cada medición. Se blanquea el NanoDrop con 1 µl de agua DEPC o buffer de elución E1, previo a la cuantificación de ADN obtenido con el método convencional y con kit de purificación, respectivamente. Cargar de 1 a 2 µl de la solución de ADN, medir y determinar la concentración y calidad de la muestra en función de los valores de ratio 260/280 de 1.8 y ratio 260/230 de 2, en cuanto a la concentración, idealmente debería ser de 50 ng/µl aproximadamente, incluso si se encuentra entre 30 a 100 ng/µl, no representa problemas, para concentraciones superiores a 100 ng/µl se necesita diluir la muestra.

2.6.5.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Se empleó *ThermoScientific DreamTaq Green PCR Master Mix (2X)*, se ajustó la mezcla para un volumen de 25 µl, siguiendo las indicaciones del fabricante y considerando el número de primers usados en dos PCR múltiplex diferentes. La master mix para la primera PCR múltiplex consistió en 13 µl *DreamTaq Green PCR Master Mix (2X)*, 1 µl de cada uno de los 4 primers (A, E, CYT y CYT') descritos por HAAS et al. (1995), 1 µl de BSA aditivo que incrementa el rendimiento de PCR, 6 µl de agua DEPC libre de nucleasas y 1 µl de templado de ADN. La master mix para la segunda PCR múltiplex consistió en 12.5 µl *DreamTaq Green PCR Master Mix (2X)*, 1 µl de cada uno de los 5 primers (Uf, B1Rr, B2Rr, AvRr y ArRr) descritos por PULAWSKA et al., (2006), 1 µl de BSA aditivo que incrementa el rendimiento de PCR, 5.5 µl de agua DEPC libre de nucleasas y 1 µl de templado de ADN. Para la PCR convencional con primers para ADNr 16S (27f - 1492r) la master mix consistió en 13 µl *DreamTaq Green PCR Master Mix (2X)*, 1.5 µl de cada primer, 1 µl de BSA aditivo que incrementa el rendimiento de PCR, 7 µl de agua DEPC libre de nucleasas y 1 µl de templado de ADN. Los tubos de PCR se deben homogenizar por pipeteo, rotular y centrifugar por 30 segundos en microcentrífuga para eliminar burbujas del fondo del tubo y de la solución. El programa de mPCR con primers (A-E) y (CYT-CYT') consistió en una incubación inicial a 94 °C por 1 minuto, acompañada de 40 ciclos de desnaturalización a 94 °C, alineamiento a 43 °C y extensión a 72 °C por 1 minuto cada

una, seguidos de una extensión final a 72 °C por 5 minutos y posterior enfriamiento a 10 °C, al tratarse de primers específicos se espera obtener ampliaciones de 338 y 427 pb respectivamente (HAAS et al., 1995). El programa de mPCR con primers (Uf, B1Rr, B2Rr, AvRr y ArRr) consistió en una desnaturalización inicial a 94 °C por 1 minuto, acompañada de 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por un minuto, alineamiento a 67 °C por un minuto y extensión a 72 °C por 1.5 minutos, seguidos de una extensión final a 72 °C por 10 minutos y posterior enfriamiento a 4 °C; al tratarse de primers específicos se espera obtener ampliaciones de 184, 1066, 478 y 1006 pb, respectivamente (PULAWSKA et al., 2006). El programa de PCR con primers (27f y 1492r) consistió en una desnaturalización inicial a 95 °C por 10 minutos, acompañada de 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 30 segundos, alineamiento a 55 °C por 30 segundos y extensión a 72 °C por 45 segundos, seguidos de una extensión final a 72 °C por 10 minutos y posterior enfriamiento a 4 °C; se espera obtener un amplicón de aproximadamente 1500 pb.

Tabla 5-2: Secuencia de primers empleados en PCR multiplex y PCR convencional.

Primers	Secuencia (5´- 3´)	Posición objetivo	Amplicón (pb)	Referencia
A - E	ATGCCCGATCGAGCTCAAGT	1-20	338	(HAAS et al., 1995)
	CCTGACCCAAACATCTCGGCTGCCCA	338-313		
CYT - CYT´	GATCG(G/C)GTCCAATG(C/T)TGT	8867-8884	427	
	GATATCCATCGATC(T/C)CTT	9293-9276		
UF f - B1R r	GTAAGAAGCGAACGCAGGGAAGT	171-193	184	(PULAWSK A et al., 2006)
	GACAATGACTGTTCTACGCGTAA	338-360		
UF f - B2R r	TCCGATACCTCCAGGGCCCCCTCACA	1207-1230	1066	
UF f - AvR r	AACTAACTCAATCGCGCTATTAAC	640-662	478	
UF f - ArR r	AAAACAGCCACTACGACTGTCTT	1150-1173	1006	
27 f - 1492 r	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	8-27	1500 aprox.	
	GGTTACCTTGTTACGACTT	1492-1507		

Realizado por: Tandapilco Llumitaxi, Wladimir, 2019

2.6.5.5. Revelado por electroforesis en gel de agarosa

Se preparó 50 ml de un gel de agarosa al 1% en buffer TBE, se adiciona 4 µl de bromuro de etidio como intercalante y se vierte en la placa de electroforesis, una vez solidificado, se retiran los peines, la placa se coloca en la cubeta de electroforesis y se inunda con buffer TBE. En cada pocillo del gel se cargó 4 µl del producto de PCR de cada tubo, en el primer pocillo se cargó 4 µl de un marcador de 100 pb; la electroforesis se corrió a 110 Voltios por 35 minutos, el gel se

revela en un transiluminador UV, se registró el resultado; los amplicones de interés se enviaron a Macrogen, Inc., en Corea del Sur para su secuenciación y posterior análisis de secuencia y asignación taxonómica mediante el programa BLAST N del NCBI.

CAPÍTULO III

3. MARCO DE DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

3.1. Formulación de medios de cultivo

Los medios de cultivo se formularon de acuerdo a las especificaciones detalladas en metodología, el medio de sales AT presento color pardo-amarillento con un pH de 7.1 mientras que el medio D1 presento color azul-verdoso con valor de pH de 7.3.

3.2. Aislamiento de cepas bacterianas

3.2.1. Crecimiento en medios semiselectivos

Tabla 1-3: Número de colonias aisladas de dos medios de cultivo semi-selectivos.

Muestra	Numero de colonias diferenciadas		Muestra	Numero de colonias diferenciadas	
	Medio D1	Sales AT		Medio D1	Medio D1-E
Tumor 1	1	0	Agalla 1	1	1
Tumor 2	0	5	Agalla 2	1	2
Tumor 3	1	1	Agalla 3	1	1
Tumor 4	2	1	Agalla 4	1	2
	4	7		4	6

Realizado por: Tandapilco Llunitaxi, Wladimir, 2020

Las placas estriadas con el macerado del tejido tumoral se incubaron durante 7 días a 28 °C. La inspección visual de crecimiento se llevó a cabo a partir de las 72 horas, tiempo en que cepas de *Agrobacterium tumefaciens* tardan en llegar a la fase estacionaria de desarrollo y presentar colonias diferenciadas; sin embargo, ALIPPI et al., (2011) y otros autores sostienen que en medios de cultivo selectivos las colonias pueden tardar en aparecer hasta 7 días, tiempo que depende de cada cepa, por lo que es recomendable esperar el desarrollo de aquellas cepas que crecen más lentamente.

El aislamiento se llevó a cabo en dos etapas: el primer aislamiento consistió en utilizar muestras de tejido tumoral de rosas presuntamente infectadas por *Agrobacterium* spp. almacenadas en IDgen, para esta etapa se empleó los medios semiselectivos sólidos D1- K₂TeO₃ y sales AT. El crecimiento en medio D1 adicionado con telurito de potasio y cicloheximida fue muy limitado, de acuerdo con ALIPPI et al., (2011) se debería a que la adición de telurito de potasio confiere mayor selectividad al medio, incluso al punto de restringir el desarrollo de cepas pertenecientes a *Agrobacterium biovar 2*, aunque se conoce que ciertas especies de *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Synorhizobium* también crecen en este medio; el crecimiento se reportó a los 7 días, observándose algunas colonias muy pequeñas que se confundían con los fragmentos del macerado vegetal depositados en la superficie del medio, dificultando la caracterización macroscópica de colonias. El medio de sales AT promovió el desarrollo de colonias en mayor cantidad y en menor tiempo, evidenciándose el crecimiento a los 3 días.

El segundo aislamiento se llevó a cabo luego de aplicar las pruebas bioquímicas y moleculares a los primeros aislados bacterianos y haber obtenido resultados no satisfactorios habiéndose empleado muestras ingresadas recientemente a la colección de muestras de IDgen. Con el fin de promover el crecimiento bacteriano en medio selectivo D1, se empleó una etapa previa de enriquecimiento selectivo en caldo D1 por 72 horas, de acuerdo a las consideraciones hechas por LÓPEZ et al., (1997), luego de la incubación se evidenció un cambio de color en los tubos, tres de los tubos incluido en control positivo presentaron un color verde olivo claro, un tubo se mantuvo de color azul y otro presentó un color azul intenso o grisáceo. Las placas inoculadas con el macerado vegetal pre-enriquecido presentaron un buen crecimiento, y a partir de las 72 horas de incubación se obtuvieron colonias aisladas y diferenciadas.

En total se recuperaron 21 cepas bacterianas: 11 del primer aislamiento, que incluyeron cepas que fueron resembradas en D1 a partir de colonias aisladas de agar AT y del macerado de agalla, y 10 cepas del segundo aislamiento; todas fueron transferidas a medio LB sólido suplementado con cicloheximida mediante la técnica de estría cruzada y repique en cuadrícula, realizándose entre 3 a 5 repiques. Las cepas fueron caracterizadas morfológicamente y almacenadas en refrigeración a 4 °C para su posterior caracterización bioquímica.

Las características morfológicas de aquellos aislados son descritas en el apartado de morfología, en la tabla 2-3.

3.2.2. Resiembra y capacidad de crecimiento en medio D1

Tras la caracterización morfológica de los aislados transferidos y purificados en LB, se descartaron 4 de las 7 cepas obtenidas en el primer aislamiento debido a que luego de la tinción Gram se evidenció que no cumplían con la morfología esperada para el género *Agrobacterium*, es decir, no correspondieron a bacilos Gram (-) mientras las cepas que sí correspondieron a bacilos Gram negativos procedieron únicamente de colonias aisladas del medio de sales AT y no de D1, como era de esperarse por tener mayor selectividad para *A. tumefaciens*. Se realizó una resiembra de las 3 cepas en medio D1 para verificar su capacidad de crecimiento en este medio, además, se volvió a inocular las muestras del macerado utilizado en la primera siembra, obteniéndose un total de 7 colonias diferenciadas: 2 provenientes del macerado del tumor 4, 2 correspondientes a la cepa T2AT1-1LB, 2 correspondientes a la cepa T2AT1-2LB y una correspondiente a la cepa T2AT2-LB; estas colonias se caracterizaron por ser circulares, brillantes, convexas, de borde entero más claro, de color entre marrón y verde oliva oscuro. Las nuevas cepas se incluyeron para la caracterización bioquímica.

El medio D1 se elaboró según la formulación descrita por la mayoría de autores, sin la adición de telurito de potasio; si bien es cierto que esta sustancia ejerce presión selectiva y confiere un color característico a las colonias de *Agrobacterium*, conforme a lo indicado por MOUGEL et al., (2001) se esperaba que dichas colonias presenten color negro metálico, sin embargo, las colonias desarrolladas en D1-K₂TeO₃ presentaron un color verde olivo oscuro. Hay que mencionar que no se dispone de suficiente bibliografía en donde se describa la morfología exacta de las colonias de *A. tumefaciens* que crecen en D1-K₂TeO₃. Según ALIPPI, (2011) el telurito de potasio se implementó en la composición del medio D1 y presentó buenos resultados, por otro lado, la capacidad para tolerar este componente es variable y podría impedir el crecimiento de cepas de *Agrobacterium* sensibles a la dosis de telurito de potasio dispensada al medio.

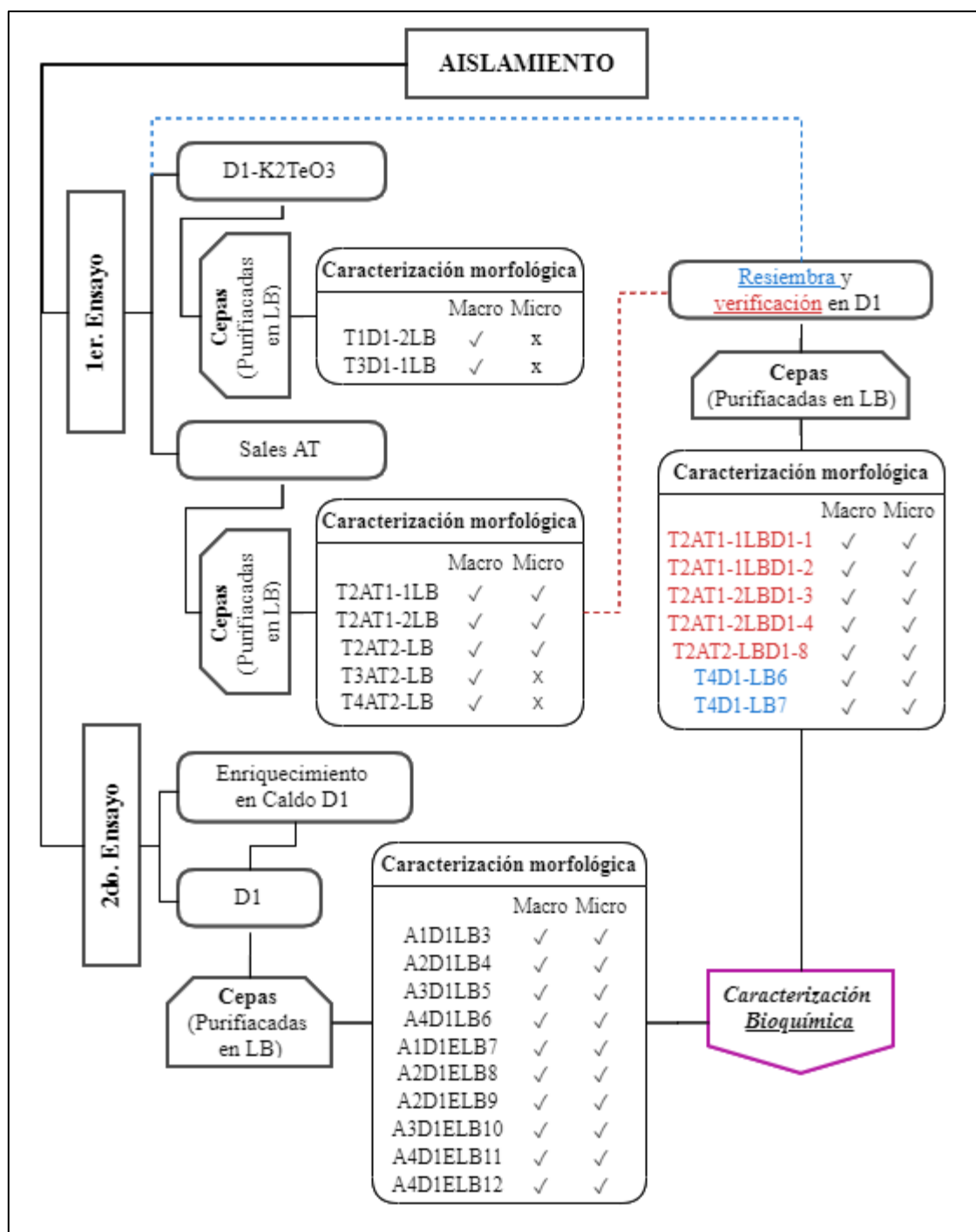


Gráfico 1-3: Cepas bacterianas obtenidas en dos etapas de aislamiento con medios semiselectivos: sales AT, D1-K₂TeO₃, D1 y D1 pre-enriquecido.

Realizado por: Tandapilco Llumitaxi, Wladimir, 2020

3.3. Caracterización morfológica

3.3.1. Morfología macroscópica

Los aislados transferidos a agar Luria Bertani se seleccionaron a partir de las colonias desarrolladas en medios semiselectivos. Se usó el medio mínimo AT como medio semiselectivo para el aislamiento de *A. tumefaciens*, en este medio suelen adicionarse opinas como fuente de carbono en conjunto con manitol y/o sulfato de amonio para satisfacer los requerimientos de C/N, de acuerdo a KIM y FARRAND, (1996) *A. tumefaciens* tiene la capacidad de usar opinas como sustrato selectivo, al no disponer de opinas el medio fue suplementado únicamente con manitol y sulfato de amonio. No se encontró referencias respecto a la morfología que presentan las colonias de *Agrobacterium* spp. en este medio y se seleccionaron colonias circulares, con borde entero, convexas, superficie lisa, color entre blanco, beige y amarillento opaco, consistencia viscosa, translucidas u opacas. El otro medio usado fue agar semiselectivo D1, según (ALIPPI et al., 2011; OH, 2014; GUPTA et al., 2015) la morfología esperada para cepas de *Agrobacterium tumefaciens* en D1 correspondería a colonias con borde entero, convexas de superficie lisa, con coloración entre marrón-amarillento a verde-oliva oscuro, bordes color amarillo-verdoso más claros, consistencia viscosa, translucidas y brillantes.

Las cepas *A. tumefaciens* biovar 1 crecen vigorosamente en agar Luria Bertani, mientras que las de biovar 2 pueden tener crecimiento restringido por el alto contenido de sal del medio, en dicho medio las colonias de *Agrobacterium tumefaciens* son convexas brillantes de forma circular con borde entero, despigmentadas de apariencia blanca a beige o rosa pálido, en medios con alto contenido de carbohidratos presentan consistencia mucosa debido a la abundante producción de exopolisacáridos (MATTHYSSE, 2006).

La morfología que presentaron los clones cultivados en agar LB tras la incubación a 28°C por 72 horas corresponde con la descrita anteriormente, a excepción de las cepas: T1D1-2LB, T3D1-1LB, A2D1ELB8 y A3D1ELB10 que no se presentaron translucidas brillantes sino más bien opacas, la cepa T3D1-1LB es la que menos concuerda con la morfología de colonia para *A. tumefaciens* por lo que se sospecha que estas cepas no sean miembros de este género.

Tabla 2-3: Caracterización morfológica macroscópica de colonias aisladas con medios semi selectivos.

Código de cepa	Forma	Borde	Elevación	Superficie	Color	Consistencia	Luz transmitida	Luz reflejada
T1D1-2LB	C	E	Co	L	B	V	O	O
T2AT1-1LBD1-1	C	E	Co	L	B	V	Tr	Br
T2AT1-1LBD1-2	C	E	Co	L	B	V	Tr	Br
T2AT1-2LBD1-3	C	E	Co	L	B	V	Tr	Br
T2AT1-2LBD1-4	C	E	Co	L	B	V	Tr	Br
T2AT2-LBD1-8	C	E	Co	L	B	V	Tr	Br
T3D1-1LB	Ir	O	P	L	B	V	O	O
T3AT2LB	C	E	Co	L	B	V	Tr	Br
T4AT2LB	C	E	Co	L	B	V	Tr	Br
T4D1-LB6	C	E	Co	L	B	V	Tr	Br
T4D1-LB7	C	E	Co	L	B	V	Tr	Br
A1D1LB3	C	E	Co	L	B	V	Tr	Br
A2D1LB4	C	E	Co	L	B	V	Tr	Br
A3D1LB5	C	E	Co	L	B	V	Tr	Br
A4D1LB6	C	E	Co	L	B	V	Tr	Br
A1D1ELB7	C	E	Co	L	OC	V	Tr	Br
A2D1ELB8	C	E	Co	L	OC	V	O	Br
A2D1ELB9	C	E	Co	L	B	V	Tr	Br
A3D1ELB10	C	E	Co	L	BH	V	O	Br
A4D1ELB11	C	E	Co	L	OC	V	Tr	Br
A4D1ELB12	C	E	Co	L	B	V	Tr	Br

Realizado por: Tandapilco Llumitaxi, Wladimir, 2020

Forma: Circular (C); Irregular (Ir)

Borde: Entero (E); Lobulado (Lo); Ondulado (O)

Elevación: Convexa (Co); Pulvinada (Pu); Plana (P)

Superficie: Lisa (L); Rugosa (Ru)

Color: Blanca (B); Ocre Claro (OC); Blanco hueso (BH); Beige (Be)

Consistencia: Viscosa (V); Cremosa (Cr)

Luz Transmitida: Translúcida (T); Opaca (O)

Luz Reflejada: Brillante (Br); Opaca (O)

3.3.2. Morfología microscópica.

Tabla 3-3: Caracterización morfológica microscópica de cepas presuntas de *A. tumefaciens*.

Código de cepa	Forma	Tinción Gram
T1D1-2LB	Cocos	-
T2AT1-1LBD1-1	Bacilos	-
T2AT1-1LBD1-2	Bacilos	-
T2AT1-2LBD1-3	Bacilos	-
T2AT1-2LBD1-4	Bacilos	-
T2AT2-LBD1-8	Bacilos	-
T3D1-1LB	Cocos	+
T3AT2LB	Bacilos	+
T4AT2LB	Cocos	-
T4D1-LB6	Bacilos	-
T4D1-LB7	Bacilos	-
A1D1LB3	Bacilos	-
A2D1LB4	Bacilos	-
A3D1LB5	Bacilos	-
A4D1LB6	Bacilos	-
A1D1ELB7	Bacilos	-
A2D1ELB8	Bacilos	-
A2D1ELB9	Bacilos	-
A3D1ELB10	Bacilos	-
A4D1ELB11	Bacilos	-
A4D1ELB12	Bacilos	-

Realizado por: Tandapilco Llumitaxi, Wladimir, 2020.

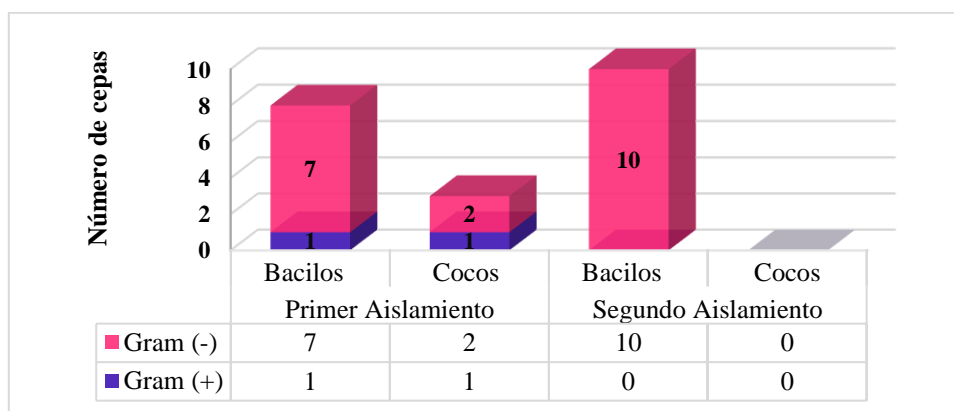


Gráfico 2-3: Clasificación bacteriana mediante tinción Gram.

Realizado por: Tandapilco Llumitaxi, Wladimir, 2020.

La caracterización microscópica consistió en la aplicación de tinción Gram, una de las técnicas básicas más importantes a la hora de caracterizar bacterias y consiste en aplicar colorantes que permitan visualizar y diferenciar la morfología celular en base a la forma y al contenido de peptidoglucano de la pared celular bacteriana; entre el primer y segundo aislamiento se reunió un total de 21 cepas, 17 correspondieron a bacilos Gram negativos y se visualizaron dispuestas en pares o aisladas cumpliendo con los rasgos típicos de *A. tumefaciens*, estas cepas se conservaron en refrigeración mientras que las demás fueron excluidas de la posterior caracterización bioquímica.

3.4. Caracterización bioquímica

Tabla 4-3: Caracterización bioquímica de cepas presuntas de *A. tumefaciens*.

Código de cepas	Catalasa	Oxidasa	PDA-CaCO3	SIM			Crecimiento en K2TeO3	3-cetolactosa
				H2S	Motilidad			
					28 °C	35 °C		
AT GU3103 1	+	-	-	-	+	-	+	-
ATGU3103 2	+	-	-	-	+	+	-	-
T2AT1-1LBD1-1	+	+	-	-	-	-	+	-
T2AT1-1LBD1-2	+	+	-	-	-	+	+	-
T2AT1-2LBD1-3	+	+	+	-	-	+	+	-
T2AT1-2LBD1-4	+	-	+	-	-	-	-	-
T2AT2-LBD1-8	+	+	-	-	-	-	+	-
T4D1-LB6	+	+	-	-	+	-	+	-
T4D1-LB7	+	+	-	-	+	+	+	-
A1D1LB3	+	-	+	-	+	+	-	-
A2D1LB4	+	-	+	-	+	+	+	-
A3D1LB5	+	+	-	-	-	-	-	-
A4D1LB6	-	-	+	-	+	+	+	-
A1D1ELB7	+	+	-	-	+	+	-	-
A2D1ELB8	+	+	-	-	+	+	-	-
A2D1ELB9	+	-	-	-	-	-	+	-
A3D1ELB10	+	+	-	-	-	-	-	-
A4D1ELB11	-	-	+	-	+	-	+	-
A4D1ELB12	+	-	+	-	-	+	-	-

Realizado por: Tandapilco Llunitaxi, Wladimir, 2020

La tabla 4-3 muestra un total de 17 cepas reunidas entre el primer y segundo aislamiento, más 2 cepas que fueron usadas como control positivo, las dos cepas se obtuvieron luego se inoculó la cepa control ATGU3101 “A” sobre medio D1 y obtener dos tipos de colonias. Los aislados y cepas control se sometieron a un conjunto mínimo de ocho pruebas bioquímicas, dentro de estas se incluyó dos pruebas de lectura inmediata (catalasa y oxidasa) y seis pruebas que requerían de incubación, tres de estas fueron pruebas generales (producción de H₂S, motilidad a 28 y 35 °C) y tres fueron específicas (aclaramiento ácido en PDA-CaCO₃, tolerancia al telurito de potasio y producción de 3-cetolactosa), estas últimas permitieron dar un acercamiento a la asignación del género y facilitaron la selección de clones para la caracterización molecular final.

Las pruebas bioquímicas permiten indagar la taxonomía de un microorganismo, generalmente se logra determinar su género, en algunos casos se puede llegar a identificar su especie, de acuerdo a MOORE et al., (2001) existe un conjunto de pruebas bioquímicas capaces de asignar la especie o biovar de forma confiable a las cepas de *Agrobacterium* (tabla 2-1); sin embargo, en vista que no se disponía de todas las sustancias se eligió ocho pruebas en base a los reactivos disponibles y a las pruebas más citadas en bibliografía, los resultados de su aplicación se detallan en el siguiente gráfico.

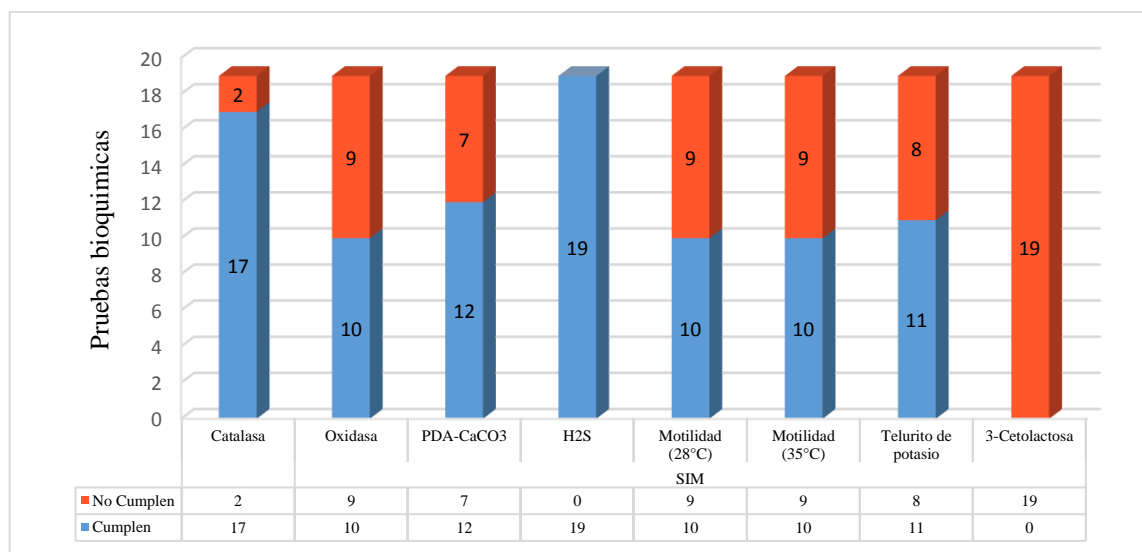


Gráfico 3-3: Resultados de la caracterización bioquímica de 19 cepas putativas de *A. tumefaciens*.

Realizado por: Tandapilco Llumitaxi, Wladimir, 2020

Las pruebas de lectura inmediata consistieron en verificar la producción de catalasa y oxidasa, ambas pruebas permiten identificar a bacterias dependientes y/o tolerantes a oxígeno, por su parte la catalasa actúa como antioxidante eliminando el peróxido de hidrógeno derivado del metabolismo oxidativo de carbohidratos, mientras que la oxidasa participa en la cadena respiratoria donde el oxígeno es el aceptor final de electrones. De las 19 cepas analizadas, 15 clones y las 2 cepas control dieron positivo a la producción de catalasa, mientras que solo 10 de los aislados dieron positivo a la producción de oxidasa, sin embargo, las cepas control dieron negativo a la producción de oxidasa. Generalmente *A. tumefaciens* es oxidasa positiva, no obstante, estos resultados están acorde a lo planteado por YOUNG et al., (2015) donde indica que *Agrobacterium* es totalmente dependiente de oxígeno, aunque la mayoría de cepas son capaces de proliferar en entornos con baja disponibilidad de oxígeno, como dentro del tejido vegetal; además, algunas cepas actúan como anaerobias en presencia de nitratos, de manera que una cepa de *Agrobacterium tumefaciens* no necesariamente debería ser positiva a la prueba de catalasa y/o oxidasa (TIWARY et al., 2007).

La prueba de producción de H₂S y motilidad se llevó a cabo en medio semisólido SIM, de las 19 cepas sembradas ninguna presentó ennegrecimiento del medio, indicando que no son productoras de ácido sulfhídrico, estos resultados están acorde con TIWARY et al., (2007) donde se describe las características bioquímicas de dos cepas identificadas como *A. tumefaciens* que dieron negativo a la producción de H₂S.

En cuanto a motilidad, se obtuvieron 10 cepas que dieron positivo para cada temperatura de incubación, sin embargo, las cepas que dieron positivo a motilidad a 28 °C no se correspondieron totalmente con las que fueron positivas para motilidad a 35°C, tal como sucedió con la cepa control ATGU3101-1 que dio positivo a motilidad a 28 °C, pero negativo para motilidad a 35 °C, el objetivo de verificar la motilidad a dos temperaturas de incubación en medio semisólido se debe a que la temperatura puede facilitar o inhibir la motilidad; de acuerdo a YOUNG et al., (2015) *Agrobacterium* spp., presenta de 1 a 4 flagelos peritricos que permiten su motilidad en medio semisólido con pH 7. Además, las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* pueden crecer a 35 °C, de manera que también se pudo verificar si los clones cumplían con esta condición.

La prueba de PDA-CaCO₃ se usa para distinguir *Agrobacterium* biovar 2 de los demás biovars, se basa en la formación de un anillo trasparente alrededor de las colonias en medio PDA suplementado con carbonato de calcio, característica típica del metabolismo de la glucosa de *A. rhizogenes*. Sin embargo, se decidió incluirla aquí en vista que *A. tumefaciens* no produce la cantidad suficiente de ácido para disolver el carbonato de calcio del medio y por ende no es capaz de formar el halo de aclaramiento ácido (MOORE et al., 2001; HWANG et al., 2013). De las 19 cepas probadas 12 incluyendo las 2 cepas control dieron negativo a la prueba de aclaramiento ácido, lo que señalaba a estas cepas como buenas candidatas a ser incluidas en el biovar 1 de *A. tumefaciens*.

Inicialmente se pensaba usar el telurito de potasio como componente del medio D1 para el aislamiento, pero en vista que este objetivo no tuvo éxito se optó por usarlo en la caracterización bioquímica; para esta prueba se empleó medio YEM suplementado con K₂TeO₃ a 60 ppm, esta prueba permite identificar cepas del género *Agrobacterium* que son capaces de crecer tolerando la toxicidad del telurito de potasio, reduciéndolo a telurito metálico y confiriéndole un color negro a los depósitos bacterianos. La cepa control ATGU3101-1 y 10 de los aislados crecieron y presentaron la morfología antes descrita en YEM-K₂TeO₃, estos aislados serían buenos candidatos de pertenecer a *A. tumefaciens*, por otro lado, la presunta cepa control ATGU3101-2 fue negativa dando a sospechar que no se trataría de *Agrobacterium* sino de otra especie bacteriana que habría contaminado la placa que contenía el control positivo, además, se sabe que otros miembros de la familia *Proteobacteria* (*Rhodobacter* spp., *Rhodopseudomonas palustris*, *Bradyrhizobium* spp., y *Rhizobium* spp.) toleran el telurito de potasio y presentan colonias circulares de color negro brillante, por lo que es necesario realizar otras pruebas que sustenten la identidad de los aislados telurito de potasio positivos (MOUGEL et al., 2001; OH, 2014).

La prueba de producción de 3-cetolactosa es sin duda la más recurrente en bibliografía debido a su confiabilidad a la hora de distinguir *Agrobacterium tumefaciens* (biovar 1) tanto de otros géneros como de otras especies que integran el género *Agrobacterium* (ALIPPI et al., 2011; FINER et al., 2016). El biovar 1 tiene la particularidad de producir 3-cetoglucosidos como la 3-cetolactosa que tiende a acumularse en el medio al contorno de las colonias. Para probar la presencia de la 3-cetolactosa se añadió aproximadamente 2 ml de reactivo de Benedict a la placa, cubriendo cuidadosamente la masa bacteriana y dejando en reposo, la prueba se considera positiva cuando

se forma un anillo color rojo ladrillo tras 2 horas de incubación; de las 19 cepas probadas ninguna logro dar positivo a este ensayo, incluso las 2 presuntas cepas control fueron 3-cetolactosa negativas; lo que podría deberse a que las cepas control sean capaces de metabolizar la 3-cetolactosa como fuente de carbono dando falsos negativos como lo indica JANSSENS et al., (1983), donde se reporta cepas fidedignas de *A. tumefaciens* que consumían la 3-cetolactosa; en cuanto a los aislados se sospecha que no se tratasen de *Agrobacterium tumefaciens*, no obstante, considerando que se requiere de más pruebas bioquímicas para poder dilucidar si corresponde al biovar de interés, sería prematuro descartar los aislados sin someterlos a caracterización molecular para confirmar dicha suposición.

Con la aplicación de pruebas bioquímicas se pretendía discriminar entre cepas presuntas de *Agrobacterium tumefaciens* de otras cepas de saprobios del suelo como: *Rhizobium*, *Erwinia* y *Pseudomonas* que se encuentran comúnmente asociados a la rizosfera y al rizoplaneo de cultivos de interés comercial. Particularmente, FAIST et al., (2016) reporta una cepa de *Pseudomonas putida* que posee un metabolismo versátil que le permite consumir el ácido indol-3-acético (IAA) como fuente de carbono, además de otras especies del género que son capaces de metabolizar las opinas, posibilitando que estas bacterias colonicen las agallas, dichas bacterias también son capaces de desarrollar en medio semi-selectivo D1. La dificultad para discriminar entre posibles cepas de *A. tumefaciens* de la microbiota foránea asociada a la agalla de la corona se debió a que ninguna de las cepas de trabajo incluido las cepas control cumplieron con el total de rasgos bioquímicos reportados en bibliografía, por otro lado, teniendo en cuenta que *Agrobacterium* biovar 1 es un grupo bastante heterogéneo que abarca la mayoría de miembros de este género es habitual que las cepas salvajes presenten diferencias en una o varias de sus características bioquímicas con respecto a lo indicado por YOUNG et al., (2015).

Finalmente se procedió a la selección de clones para la caracterización molecular, donde se escogió 9 cepas, 3 del primer y 6 de segundo aislamiento respectivamente, se tomaron aquellas que cumplieran con al menos 5 de las 8 características bioquímicas que se esperaban para cepas de *Agrobacterium tumefaciens*.

Al observar la ambigüedad de los rasgos bioquímicos de la presunta cepa control de *A. tumefaciens* y considerando que se halló contaminación por cocos y estreptococos, se intentó recuperar la cepa control mediante purificación a partir de las colonias crecidas en agar D1, obteniéndose 2 cepas morfológicamente distintas correspondientes a bacilos Gram negativos y aunque no cumplieron satisfactoriamente con el total de pruebas bioquímicas se incluyeron como cepas de referencia para la siguiente etapa de caracterización molecular.

3.5. Caracterización molecular

3.5.1. Cuantificación de ADN

Tabla 5-3: Matriz de determinación de concentración y calidad del ADN.

ID muestra	Concentración (ng/μl)	A260 (Abs)	A280 (Abs)	260/280	260/230
ATGU3103A_1	190,1	3,802	3,349	1,14	0,41
PAT02	550,2	11,004	5,568	1,98	1,9
PAT06	525	10,5	5,385	1,95	1,75
PAT07	409,7	8,194	4,289	1,91	1,37
ATGU3103A_2	33,3	0,665	0,324	2,05	1,1
PAT01	60,3	1,205	0,605	1,99	1,36
PAT03	91,3	1,825	0,91	2,01	1,92
PAT08	84,3	1,687	0,846	1,99	1,78
LB4	54,9	1,098	0,722	1,52	0,48
LB7	338,8	6,775	3,388	2	0,49
LB8	56	1,121	0,701	1,6	0,59

Realizado por: Tandapilco Llumitaxi, Wladimir, 2020

La tabla 5-3 recopila los valores de concentración de ADN que se encuentran entre 33,3 y 550,2 ng/μl e índices de pureza entre 1,14 a 2,05 y 0,41 a 1,92; según DESJARDINS y CONKLIN, (2010), para que el ADN sea considerado de buena calidad debe presentar valores de 1,8 y 2 para los ratios 260/280 y 260/230 respectivamente, para valores de ratio 260/280 inferiores a 1,8 se atribuye interferencia por proteínas y compuestos fenólicos, mientras que si su valor es mayor a 1,9 la contaminación se debe a la presencia de ARN o nucleótidos libres, para valores de ratio 260/230 inferiores a 1,8 se atribuye la contaminación por reactivos de extracción y carbohidratos, con los valores de ratio 260/280 expuestos en la tabla podemos suponer que existe contaminación con ARN, mientras que los valores de ratio 260/230 indicarían contaminación por carbohidratos,

considerando que las colonias presentaron alta producción de exopolisacáridos, lo que se evidenció en el proceso de extracción debido a que no se tuvo una separación de fases eficiente, necesitando más etapas de centrifugación; incluso las dos muestras control y la muestra LB7 requirieron de purificación con *kit PureLink™ Quick Gel Extraction & PCR Purification Combo Kit K220001 de invitrogen*.

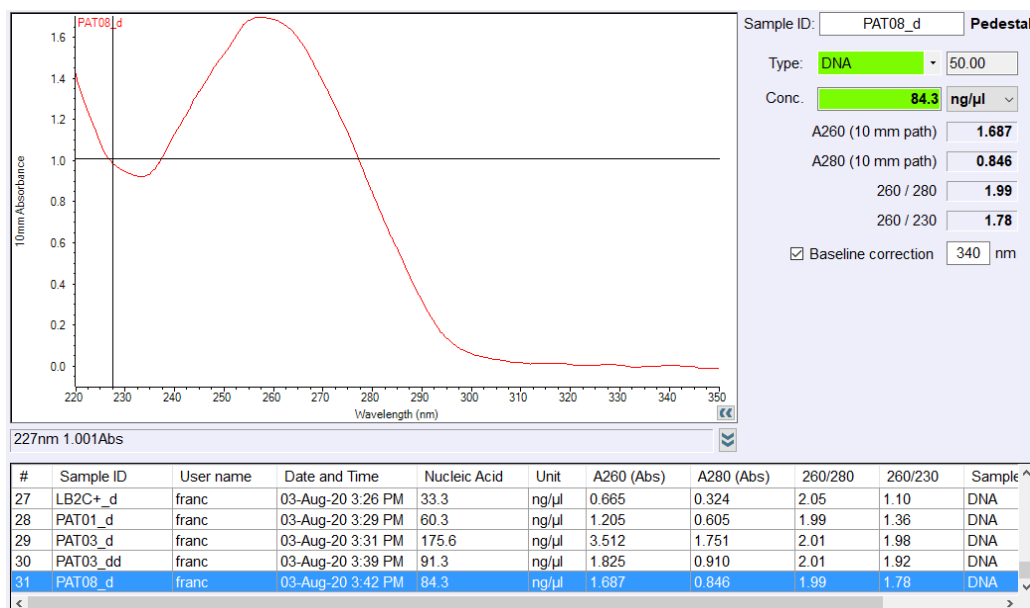


Gráfico 4-3: Espectrofotograma de ADN de PAT08 medida a 260 nm con NanoDrop 2000.

Realizado por: Tandapilco Llumitaxi, Wladimir, 2020

3.5.2. Producto de PCR para la región *virD2* e *ipt*

Tanto los primers que amplifican en la región de genes *virD2* e *ipt* actúan sobre regiones conservadas del plásmido Ti, los primers *virD2* corresponden a una región conservada que codifica para la endonucleasa que escinde el ADN-T, mientras que los primers de *ipt* pertenecen a la región de oncogenes que codifica la isopentenil transferasa, responsable de la sobreproducción de hormonas vegetales causantes de la formación de la agalla, de tal manera que con los primers (A-E) de *virD2* se amplificara una banda de 338 pb para cualquier cepa de los 3 biovares virulentos de *Agrobacterium*, mientras que con los primers (CYT-CYT') de *ipt* se amplificara una banda de 427 pb únicamente para cepas de *A. tumefaciens*. Para el revelado de amplicones se usó un marcador de peso molecular de 100 pb, ni el control positivo ni las muestras

PAT02 y PAT06 presentaron algún producto de amplificación; no obstante, la muestra PAT07 reveló un amplicón de aproximadamente 750 pb. HAAS et al., (1995) indicó la presencia de un producto de PCR de origen desconocido de 730 pb aproximadamente en una PCR múltiple que se llevó a cabo con la cepa de *A. tumefaciens* IL20 y primers ipt (CYT-CYT') y virD2 (A-E'), de manera que el amplicón obtenido en nuestra PCR multiplex podría corresponder a un producto inespecífico procedente de una cepa salvaje *Agrobacterium tumefaciens*.

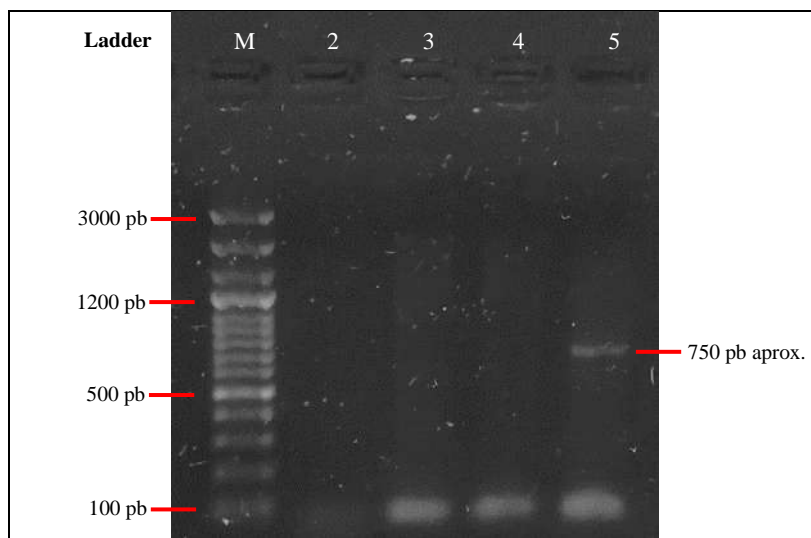


Figura 1-3: Revelado del producto de mPCR en gel de agarosa al 1%.

Pocillo 1, marcador; pocillo 2, control positivo; pocillos de 3 a 5, PAT02, PAT06 y PAT07 respectivamente, en el pocillo 5 existe un amplicón de 750 pb aproximadamente.

Realizado por: Tandapilco Llumitaxi, Wladimir, 2020

En vista que la cepa control ATGU3101A_1 no amplificó, y que la cepa PAT07 produjo un amplicón no esperado de aproximadamente 750 pb, se pensó que el resultado obtenido con la cepa control se habría debido a dos razones: la primera, que el ADN no sea de buena calidad lo cual tiene sentido considerando los datos espectrales de la tabla 5-3 y la segunda que la muestra de ADN de la cepa control no pertenezca únicamente a *A. tumefaciens*, pudiendo así el ADN foráneo inhibir la amplificación. En el segundo caso se debía verificar si el amplicón encontrado pertenecía a *A. tumefaciens*. Para ello la cepa control y la cepa PAT07 fueron sometidas a una PCR convencional con primers universales de ADNr 16S (27f y 1492r); como era de esperarse no se detectó ningún producto de amplificación para la cepa control confirmando que la calidad

del ADN no era lo suficientemente buena para permitir su amplificación, mientras que la cepa PAT07 si produjo un amplicón de aproximadamente 1500 pb, típico producto de amplificación del ADNr 16S con primers universales empleados en identificación bacteriana (RODICIO y MENDOZA, 2004). El producto de PCR se envió a Macrogen para su secuenciación y posterior identificación mediante alineamiento de secuencias con la herramienta BLAST N del NCBI.

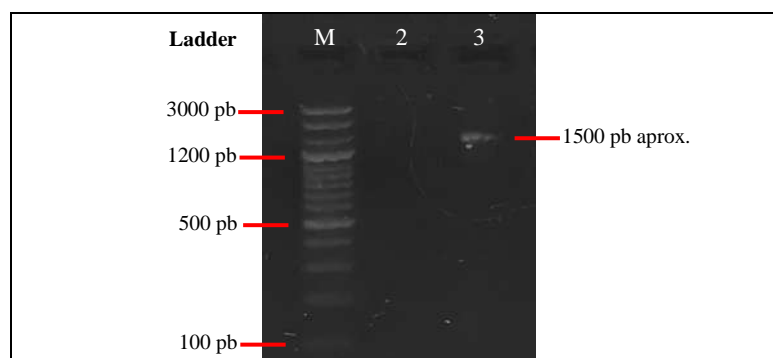


Figura 2-3: Revelado del producto de PCR en gel de agarosa al 1%.

Pocillo 1, marcador de 100 pb; pocillo 2, control positivo ATGU3101_1; pocillo de 3, muestra PAT07, presenta un amplicón de 1500 pb aproximadamente.

Realizado por: Tandapilco Llumitaxi, Wladimir, 2020

3.5.3. *Producto de PCR para la región del ADNr 23S*

La PCR múltiple conto con un conjunto de 5 primers, un primer universal directo UFf y 4 primers antisentido B1Rr, B2Rr, AvRr, ArRr, diseñados de acuerdo a las diferencias en la secuencia del ADNr 23S, la particularidad de esta PCR es que permite identificar simultáneamente el biovar 1, biovar 2, *A. vitis* y *A. rubí*, mediante productos de amplificación de 184 pb, 1066 pb, 478 pb y 1006 pb respectivamente (PULAWSKA et al, 2006). Esta PCR se llevó a cabo con las cepas ATGU3103A_2, PAT01, PAT03, PAT08, LB4, LB7 y LB8.

Para el revelado se usó marcador de peso molecular de 100 pb, se usó la cepa ATGU3101A_2 como presunto control positivo. Sin embargo, no se evidencio la presencia de amplicón en ninguno de los carriles, ni siquiera en el carril donde se cargó el presunto control positivo pese a que la concentración y calidad del ADN de este fue aceptable. Teniendo en cuenta la especificidad

y sensibilidad de esta PCR multiplex para discriminar entre 4 especies *Agrobacterium* y al no haber obtenido ningún producto de amplificación tanto con las cepas de trabajo como con la cepa control se decidió no catalogar a estas cepas como miembros del género *Agrobacterium*, basado en este resultado y en los hallazgos de las pruebas bioquímicas se puede estar seguro de que no se tuvo éxito en el aislamiento de *Agrobacterium tumefaciens*.

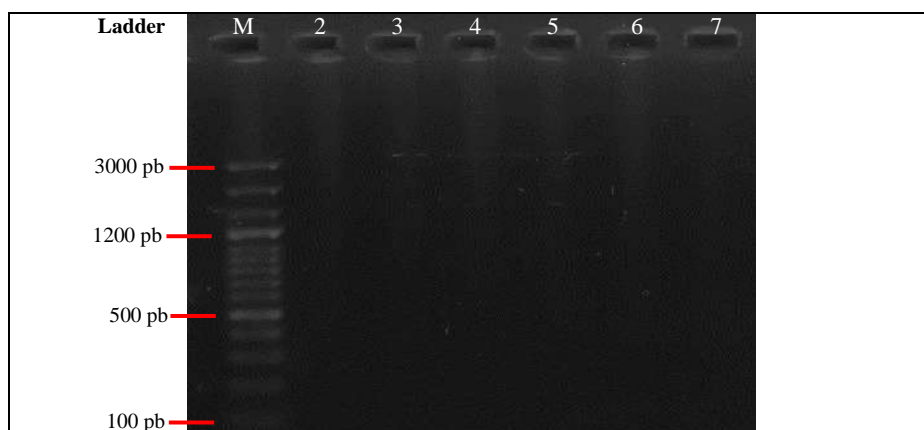


Figura 3-3: Revelado del producto de mPCR en gel de agarosa al 1%. Pocillo 1, marcador; pocillo 2, control positivo ATGU3103A_2; pocillos de 3 a 7, PAT01, PAT03, PAT08, LB4, LB7 y LB8 respectivamente, no se ve producto de amplificación.

Realizado por: Tandapilco Llumitaxi, Wladimir, 2020

3.5.4. Secuenciación de la cepa PAT07

El producto amplificado con primers 27f y 1492r de la cepa PAT07 fue enviado a Macrogen Inc., en Corea del Sur para su secuenciación. La secuencia de la cepa PAT07 se analizó mediante el alineamiento de secuencias con la herramienta BLAST N del NCBI, presentando un 95% de cobertura equivalente a un 98.44% de identidad con respecto a la cepa ATCC 12633 de *Pseudomonas putida*, de hecho la cepa PAT07 presentó las características morfológicas y bioquímicas típicas de *Pseudomonas putida*, es decir: bacilos Gram negativos motiles, positivos para catalasa y oxidasa, tolerantes al telurito de potasio y negativo para la producción de H₂S, aclaramiento ácido en PDA-CaCO₃ y 3-cetolactosa.

La presencia de *Pseudomonas* spp., dentro de la agalla de la corona no es inusual dado que se trata de una bacteria endófito que permite la formación de cristales de hielo provocando lesiones desde dentro del tejido vegetal; este es uno de los factores que facilita la infección de plantas por *A. tumefaciens*, además los tumores constituyen un entorno vital enriquecido con opinas y fitohormonas idóneo para la proliferación de bacterias que metabolizan estas sustancias ya que la agalla le confiere estabilidad y permite el incremento de la microbiota central de la agalla de la corona, como lo indica FAIST et al., (2016) en su estudio referente a la microbiota asociada a la enfermedad de agalla de la corona, donde demuestra que si bien es cierto que estas bacterias no facilitan la infección por *Agrobacterium tumefaciens* en plantas de *Vitis vinifera* sí que se benefician del ambiente de la agalla de la corona.

CONCLUSIONES

- Se aislaron un total de 21 cepas bacterianas a partir de muestras de tejido de agallas de la corona de rosas proporcionadas por IDgen empleando los medios semiselectivos sólidos D1, D1-K₂TeO₃ y medio mínimo de sales AT. De los 21 aislados, 11 corresponden a las cepas obtenidas de la siembra en D1 suplementado con telurito de potasio, de la siembra en medio de sales AT, como también las cepas obtenidas de la resiembra en medio D1 a partir de muestras de macerado tumoral de rosas que fueron conservadas en refrigeración en las instalaciones de IDgen. Las 10 cepas restantes fueron recuperadas mediante un segundo aislamiento en medio D1 a partir de muestras frescas de tejido tumoral, con o sin el empleo de una fase previa de enriquecimiento selectivo en caldo D1.
- Las 21 cepas aisladas fueron caracterizadas morfológicamente. Todas a excepción de una, presentaron colonias con morfología conforme a la esperada para *Agrobacterium tumefaciens* en medio sólido Luria Bertani de acuerdo a lo reportado en bibliografía y comparada con la cepa control ATGU3101A. En la caracterización microscópica se encontraron 17 cepas que correspondieron a bacilos Gram negativos, 7 del primero y 10 de segundo aislamiento, respectivamente, las 4 cepas excluidas se obtuvieron únicamente del primer aislamiento, una correspondió a bacilos Gram positivos, otra correspondió a cocos Gram positivos y dos últimas fueron cocos Gram negativos. Las 17 cepas procedentes de la caracterización microscópica se analizaron mediante 8 pruebas bioquímicas, donde ninguna de las cepas, incluidas las de control, cumplieron con el total de estas pruebas; resultó inusual que ninguna de las cepas dieran positivo para la prueba de producción de la 3-cetolactosa, una eficiente prueba bioquímica para identificar *A. tumefaciens*, lo que llevó a sospechar que los aislados correspondían a otras bacterias que suelen estar asociadas a la agalla de la corona de las rosas, como es el caso de especies de *Rhizobium*, *Pseudomonas* o *Erwinia*; en cuanto a las cepas control pusiera deberse a la capacidad de consumir la 3-cetolactosa por miembros de esta especie. Para probar estos planteamientos fue necesario someter los aislados y cepas control a PCR para su identificación molecular.

- Tras constatar que ninguna de las cepas presentó características bioquímicas que correspondan totalmente con lo esperado para *A. tumefaciens*, se eligió 9 cepas, 3 del primer aislamiento y 6 del segundo aislamiento, para verificar si alguna pertenecía al género *Agrobacterium* mediante amplificación por PCR múltiplex con primers específicos para *A. tumefaciens*, encontrándose que únicamente la cepa PAT07 presentó un amplicón inespecífico de aproximadamente 750 pb con primers virD2 e ipt. Tras la secuenciación parcial del ADNr 16s de esta cepa se determinó que correspondía con un 98,44% de identidad a la cepa ATCC 12633 de *Pseudomonas putida*, una bacteria saprofita oportunista que abunda en la rizosfera donde actúa descomponiendo la materia orgánica y que por su versatilidad metabólica es capaz de consumir como fuente de carbono las opinas y otros metabolitos que se acumulan al interior de los tumores causados por la infección de *Agrobacterium* spp., por lo tanto, es muy probable que no se tenga éxito al intentar aislar *Agrobacterium tumefaciens* a partir de tumores maduros o en estado necrótico; por el contrario, la población de *A. tumefaciens* tiende a disminuir a medida que los tumores envejecen y son colonizados por microorganismos saprofitos.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar el aislamiento con un mayor número de muestras, recordando que es de vital importancia que estas sean recolectadas en etapas tempranas del desarrollo del tumor ya que la población de *Agrobacterium* tiende a disminuir a medida que el tumor envejece mientras que otras especies de *Pseudomonas* y *Rhizobium* proliferan con facilidad en su entorno, lo que dificulta mucho el aislamiento de *Agrobacterium tumefaciens*. También se puede usar muestras de suelo rizosférico ya que el suelo es una fuente de *Agrobacterium* spp., debido a que es donde se depositan los restos necróticos de las plantas infectadas, donde el inoculo se disemina con facilidad hacia cultivos cercanos.
- Se recomienda usar el medio semiselectivo D1 junto con otros medios pudiendo uno ser selectivo y otro general para crecimiento y diferenciación de *Agrobacterium*, con una etapa previa de enriquecimiento selectivo y el uso de una o varias cepas control certificadas para poder establecer la morfología exacta que presenta *Agrobacterium tumefaciens* sobre los distintos medios de cultivo y así discriminar con confianza otros microorganismos asociados a los tumores que produce *A. tumefaciens*. También, se debería incrementar el número de pruebas de caracterización bioquímica como una prueba de diferenciación de *Pseudomonas* spp. en medio B de King, o a su vez implementar un sistema de pruebas bioquímicas con placas de microtitulación, en conjunto con pruebas de patogenicidad en discos de papa o de zanahoria que requieren poco tiempo y confieren mayor precisión en la caracterización bioquímica de cepas virulentas salvajes de *A. tumefaciens*.

- Se recomienda realizar la caracterización molecular únicamente a las cepas que tengan al menos un 80% de correspondencia con las propiedades bioquímicas reportadas en bibliografía para *A. tumefaciens*. También se pueden incluir aquellas cepas negativas para la prueba de producción de 3-cetolactosa, siempre y cuando cumplan satisfactoriamente con el resto de las pruebas bioquímicas, debido a que existen cepas de *A. tumefaciens* bien identificadas que son 3-cetolactosa negativas, y de ser el caso se podría perder la oportunidad de identificar un nuevo miembro de este biovar. En cuanto a los primers empleados, es importante considerar que se deben utilizar aquellos que arrojen el menor número tanto de falsos positivos como de falsos negativos o productos inespecíficos como ocurrió con la cepa PAT07, en caso de usar primers para la región de virD2 e ipt discriminar entre amplicones del tamaño reportado en bibliografía de amplicones de tamaño desconocido.

GLOSARIO

3-cetolactosa: Es un cetoglucosido producto del metabolismo oxidativo de la lactosa, es producido por *A. tumefaciens*, se lo emplea en su identificación y caracterización (BERNAERTS y DE LEY 1963).

***A. tumefaciens*:** Bacteria con forma de bacilo, Gram-negativa, motil, no esporulada, es quimio-organoheterótrofa, las cepas que causan los tumores poseen un plásmido conjugativo inductor de tumores (Ti) (YOUNG et al., 2015).

Agua DEPC: Agua ultrapura tratada con dietilpirocarbonato, libre de nucleasas para aplicaciones en biología molecular (FISHER SCIENTIFIC, 2021).

Amplicón: Producto de amplificación de material genético, corresponde a una pieza de ADN o ARN de un tamaño determinado (BOLIVAR et al., 2014).

Biovares: Grupos de cepas o individuos de una misma especie, representados por genes cromosómicos, se los cataloga de acuerdo a las características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas (LLOP et al., 2004).

BLAST N: Programa de bioinformática que compara secuencias nucleotídicas con secuencias de DNA de las bases de datos (NCBI, 2021).

Cicloheximida: Inhibidor de la síntesis proteica en eucariotas, producida por *Streptomyces griseus* (REAL ACADEMIA DE INGENIERÍA, 2021).

Electroforesis: La electroforesis es una técnica de biología molecular utilizada para separar el ADN, el ARN, o moléculas o proteínas en base a su tamaño y carga eléctrica (NHGRI, 2021).

Ladder o marcador molecular: Estándar de referencia que contiene fragmentos de ADN de longitudes conocidas (KHAN ACADEMY, 2021).

NCBI: Centro Nacional para la Información Biotecnológica.

Opinas: Las opinas resultan de la condensación de un aminoácido y un cetoácido, son compuestos no metabolizables por planta y sirven como fuente de carbono y nitrógeno para *Agrobacterium* spp (GUYON et al., 1980).

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

Plásmido Ti: ADN extracromosómico que constituye un plásmido inductor de tumores (YOUNG et al., 2015).

Primers o cebadores: Es una secuencia corta de ADN de cadena simple que se utiliza en una reacción en cadena de la polimerasa hibridar con el ADN de la muestra y definir la región del ADN que será amplificada (VOET et al., 2007).

RNAsa: La RNAsa es una endoribonucleasa que específicamente degrada ARN de simple cadena en residuos C y U (INBIO HIGHWAY, 2021).

Secuenciación de ADN: La secuenciación del ADN permite determinar el orden de las cuatro bases que forman la molécula de ADN, dicha secuencia les informa la clase de información genética que contiene un segmento específico de ADN (NHGRI, 2021).

Termociclador: Equipo usado en biología molecular para realizar los ciclos de temperaturas necesarios para la amplificación de diversas hebras de ADN en la técnica de la PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) o para reacciones de secuencia con el método de Sanger (ALLSCIENCE, 2021).

BIBLIOGRAFÍA

ALIPPI, A. M.; et al. "Métodos para la detección de *Agrobacterium* a partir de muestras de material vegetal, suelo y agua". *Revista Argentina de Microbiología* [en línea], 2011, (Argentina) 43(4), pp. 278-286. [Consulta: 15 julio 2019]. ISSN 0325-7541. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=213021188008>

ALLSCIENCE. *¿Qué es y cómo Funciona un termociclador?* [en línea]. [Consulta: 4 enero 2021]. Disponible en: <https://www.e-allscience.com/blogs/news/8477021-que-es-y-como-funciona-un-termociclador>.

BAUTISTA, J.; et al. "Inducción de supresividad a fitopatógenos del suelo. Un enfoque holístico al control biológico". *Interciencia* [en línea], 2008, (México) 33(2), pp. 96-102. [Consulta: 07 mayo 2019]. ISSN 0378-1844. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/238716593>

BÉCARES, E. "Biotecnología Ambiental, ¿la cenicienta de la Biotecnología?". *Ambiociencias*, vol. 0, n° 12 (2014), (México) pp. 81-94. ISSN 1988-3021. DOI 10.18002/ambioc.v0i12.4943.

BERNAERTS, M.J.; & DE LEY, J. "A Biochemical Test for Crown Gall Bacteria". *Nature*, vol. 197, n° 4865 (1963), (Bélgica) pp. 406-407. ISSN 1476-4687. DOI 10.1038/197406b0.

BERRÍOS, C.S.; & LLABACA, R.G. *Manual de microbiología* [en línea]. Santiago-Chile: Ediciones UC, 2018. ISBN 978-956-14-2347-3. [Consulta: 10 noviembre 2019]. Disponible en: https://books.google.com.ec/books?id=0OuaDwAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=es&source=gb_s_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false.

BOLIVAR, A.M.; et al. "PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización (PCR and PCR-Multiplex: critical parameters and standardization protocol)". *Avances en Biomedicina*, vol. 3, n° 1 (2014), (Venezuela) pp. 25-33. ISSN 2244-7881.

BOUZAR, H.; et al. "A new *Agrobacterium* strain isolated from aerial tumors on *Ficus benjamina* L". *Applied and environmental microbiology*, vol. 61, n° 1 (1995), (United State of America) pp. 65-73. ISSN 0099-2240.

BOUZAR, H.; & JONES, J. "Distinction of biovar 2 strains of *Agrobacterium* from other chromosomal groups by differential acid production". *Letters in Applied Microbiology*, vol. 15, n° 3

(1992), (United State of America) pp. 83-85. ISSN 1472-765X. DOI 10.1111/j.1472-765X.1992.tb00731.x.

BREE, L.S. Metodología para la detección de *Agrobacterium vitis* a partir de material vegetal de *Vitis vinifera* [en línea] (Trabajo de titulación). (Pregrado) Universidad Nacional de Cuyo. Facultad de Ciencias Agrarias. Mendoza, Argentina. 2015. [Consulta: 11 noviembre 2019]. Disponible en: <http://bdigital.uncu.edu.ar/7023>.

BROWN, T.; et al. *Genomas/ Genome* [en línea]. 3ra ed. Buenos Aires-Argentina: Ed. Médica Panamericana, 2008. [Consulta: 27 junio 2019] ISBN 978-950-06-1448-1. Disponible en: https://books.google.com.ec/books?id=4tYIcMOdsBwC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbse_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false.

CERVERA, S. *Prácticas de microbiología* [en línea]. 2da Edición. Logroño-España: Universidad de La Rioja, 2011. [Consulta: 12 noviembre 2019]. ISBN 978-84-694-0870-4. Disponible en: <https://es.scribd.com/document/238602740/Dialnet-PracticasDeMicrobiologia-100835>.

CIFUENTES, H.; et al. Prevención de *Agrobacterium tumefaciens* en las plantas de Rosas (*Rosa sp.*) Var. Cantata, hasta el noveno mes de siembra, ubicado en la parroquia El Quinche, cantón Quito, provincia de Pichincha [en línea] (Trabajo de titulación). (Pregrado) Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador. 2011: [Consulta: 12 junio 2019]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/666>.

CULTIMED. *Manual básico de microbiología* [en línea]. 4ª Ed. Perú: Panreac Química S.A., 2002. [Consulta: 6 noviembre 2019]. Disponible en: <https://es.scribd.com/doc/304921906/MANUAL-BASICO-DE-MICROBIOLOGIA-CULTIMED-pdf>.

DAVOODI, A.; & HAJIVAND, S. "Isolation of *Agrobacterium tumefaciens* strains from crown gall disease on imported roses plants in Qazvin province". *Journal of Ornamental and Horticultural Plants*, vol. 3, n° 2 (2013), (Irán) pp. 117-124. ISSN 2251-6441.

DESJARDINS, P.; & CONKLIN, D. "NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids". *Journal of Visualized Experiments*, n° 45 (2010), (United State of America) pp. 2565. ISSN 1940-087X. DOI 10.3791/2565.

ESCOBAR, M.A.; & DANDEKAR, A.M. "*Agrobacterium tumefaciens* as an agent of disease". *Trends in Plant Science*, vol. 8, n° 8 (2003), (United State of America) pp. 380-386. ISSN 1360-1385. DOI 10.1016/S1360-1385(03)00162-6.

FAIST, H.; et al. "Grapevine (*Vitis vinifera*) Crown Galls Host Distinct Microbiota". *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 82, n° 18 (2016), (Alemania) pp. 5542-5552. ISSN 0099-2240. DOI 10.1128/AEM.01131-16.

FERNÁNDEZ, A.; et al. *Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología* [en línea]. La Coruña-España: Seimc, 2010. [Consulta: 12 noviembre 2019]. ISBN 978-84-614-7932-0. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0213005X11001571>.

FERNÁNDEZ, C.; et al. *Guía de laboratorio de microbiología*. Quito-Ecuador: Universidad Católica del Ecuador, 2014, pp. 20-52.

FINER, K.R.; et al. "Isolation and Characterization of *Agrobacterium* Strains from Soil: A Laboratory Capstone Experience". *Journal of Microbiology & Biology Education*, vol. 17, n° 3 (2016), (United State of America) pp. 444-450. ISSN 1935-7877, 1935-7885. DOI 10.1128/jmbe.v17i3.1124.

FISHER SCIENTIFIC. *Thermo Scientific® DEPC-treated Water - Agua Productos químicos* [blog]. [Consulta: 4 enero 2021]. Disponible en: <https://www.fishersci.es/shop/products/fermentas-depc-treated-water/p-4530715>.

GUPTA, A.; et al. "Occurrence of crown gall caused by *Agrobacterium tumefaciens* on rose". *Indian Phytopathology*, vol. 68, n° 2 (2015), (India) pp. 229-230.

GUYON, P.; et al. "Agropine in «null-type» crown gall tumors: Evidence for generality of the opine concept". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 77, n° 5 (1980), (United State of America) pp. 2693-2697. ISSN 0027-8424. DOI 10.1073/pnas.77.5.2693.

HAAS, J.H.; et al. "Universal PCR primers for detection of phytopathogenic *Agrobacterium* strains". *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 61, n° 8 (1995), (United State of America) pp. 2879-2884. ISSN 0099-2240.

HERNÁNDEZ, G.; et al. "Bioremediation of organophosphates by fungi and bacteria in agricultural soils. A systematic review". *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, vol. 18, n° 1 (2017), (Colombia) pp. 138-159. ISSN 0122-8706. DOI 10.21930/rcta.vol18_num1_art:564.

HWANG, H. H.; et al. "Characterization and host range of five tumorigenic *Agrobacterium tumefaciens* strains and possible application in plant transient transformation assays". *Plant Pathology*, vol. 62, n° 6 (2013), (United State of America) pp. 1384-1397. ISSN 1365-3059. DOI 10.1111/ppa.12046.

INBIO HIGHWAY. *RNAse* [blog]. [Consulta: 4 enero 2021]. Disponible en: <https://www.inbiohw.com.ar/es/productos/168306/extraccion-y-purificacion/RNAse-A.html>.

ISLAM, S.; et al. "The *Agrobacterium tumefaciens* a potential tool for antitumor study". *Microbiology Applications*, (2013), (Bangladesh) pp. 135-151. ISSN 978-81-905771-3-7.

JANSSENS, D.; et al. "The catabolism of 3-ketolactose in *Agrobacterium*". *Systematic and Applied Microbiology*, vol. 4, n° 2 (1983), (Bélgica) pp. 155-168. ISSN 0723-2020. DOI 10.1016/S0723-2020(83)80045-9.

KADO, C.I. *Crown gall. American Phytopathological Society* [en línea]. [Consulta: 19 octubre 2020]. Disponible en: <https://www.apsnet.org/edcenter/disandpath/prokaryote/pdlessons/Pages/CrownGall.aspx>.

KADO, C.I.; & HESKETT, M.G. "Selective Media for Isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, and *Xanthomonas*". *Phytopathology*, vol. 60, n° 6 (1970), (United State of America) pp. 969. ISSN 0031949X. DOI 10.1094/Phyto-60-969.

KHAN ACADEMY. *Electroforesis en gel (artículo)* [en línea]. [Consulta: 4 enero 2021]. Disponible en: <https://es.khanacademy.org/science/ap-biology/gene-expression-and-regulation/biotechnology/a/gel-electrophoresis>.

KIM, K.S.; & FARRAND, S.K. "Ti plasmid-encoded genes responsible for catabolism of the crown gall opine mannopine by *Agrobacterium tumefaciens* are homologs of the T-region genes responsible for synthesis of this opine by the plant tumor". *Journal of Bacteriology*, vol. 178, n° 11 (1996), (United State of America) pp. 3275-3284. ISSN 0021-9193. DOI 10.1128/jb.178.11.3275-3284.1996.

LACROIX, B.; & CITOVSKY, V. "Agrobacterium". *Brenner's Encyclopedia of Genetics (Second Edition)* [en línea], 2013, (United State of America) 1, pp. 23-25. [Consulta: 19 junio 2019]. ISBN 978-0-08-096156-9. Disponible en:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123749840000255>.

LENART-BORON, A.; & BORON, P. "The Effect of Industrial Heavy Metal Pollution on Microbial Abundance and Diversity in Soils — A Review". *Environmental Risk Assessment of Soil Contamination* [en línea], 2014, (United Kingdom), pp. 759-783. [Consulta: 19 octubre 2020]. DOI 10.5772/57406. Disponible en: <https://www.intechopen.com/books/environmental-risk-assessment-of-soil-contamination/the-effect-of-industrial-heavy-metal-pollution-on-microbial-abundance-and-diversity-in-soils-a-revie>.

LLOP, P.; et al. 2004. Caracterización molecular de la pérdida del poder patógeno en agrobacterium tumefaciens [en línea] (Trabajo de titulación). (Doctoral) Universidad de Valencia, Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Genética. Valencia, España. 2004. pp. 37-92. [Consulta: 12 junio 2019]. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=7371>.

LÓPEZ, L.E.; et al. "Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología". *Investigación en Discapacidad*, vol. 3, n° 1 (2014), (México) pp. 10-18. ISSN 2007-6452.

LÓPEZ, M.M.; et al. *Selective Enrichment Improves Isolation, Serological and Molecular Detection of Plant Pathogenic Bacteria. Diagnosis and Identification of Plant Pathogens: Proceedings of the 4th International Symposium of the European Foundation for Plant Pathology* [en línea]. Bonn, Germany: Springer Netherlands, Developments in Plant Pathology, 1997, pp. 117-121. [Consulta: 21 agosto 2020]. ISBN 978-94-009-0043-1. Disponible en: https://doi.org/10.1007/978-94-009-0043-1_25.

MADIGAN, M.T.; et al. *Brock, Biología de los microorganismos* [en línea]. 12th. Madrid-España: Pearson Educación, 2009. ISBN 978-84-7829-097-0. [Consulta: 26 mayo 2019]. Disponible en: https://books.google.com.ec/books/about/Brock_biolog%C3%ADa_de_los_microorganismos_1.html?id=YlnBcQAACAAJ&source=kp_book_description&redir_esc=y.

MATTHYSSE, A.G. *The Genus Agrobacterium. The Prokaryotes: Volume 5: Proteobacteria: Alpha and Beta Subclasses* [en línea]. New York-United State of America: Springer, 2006, pp. 91-114. [Consulta: 3 septiembre 2020]. ISBN 978-0-387-30745-9. Disponible en: https://doi.org/10.1007/0-387-30745-1_5.

MONREAL, C.; et al. Desarrollo de métodos de diagnóstico molecular de enfermedades virales, bacterianas y fúngicas en hortalizas [en línea] (Trabajo de titulación). (Maestría) Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C., México. 2005. pp. 5-45. [Consulta: 8 mayo 2019]. Disponible en: <https://repositorio.ipicyt.edu.mx//handle/11627/187>.

MOORE, L.W.; et al. *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria* [en línea]. 3rd ed. Minesota-USA: APS Press, 2001. ISBN 0890542635. [Consulta: 17 noviembre 2019]. Disponible en: <https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1365-3059.2001.00635.x>

MORENO, J. A.; & VELARDE, K.E. Aislamiento, caracterización y usos potenciales de microorganismos de tierra de montaña y subtrópico durante el periodo 2016 [en línea] (Trabajo de titulación). (Pregrado) Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador. 2016. pp. 15-25. [Consulta: 10 noviembre 2019]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/6276>.

MORILLO, S. X.; & URBANO, E. Evaluación del control de *Agrobacterium tumefaciens* mediante la aplicación de agentes antibióticos en rosas [en línea] (Trabajo de titulación). (Pregrado) Escuela Politécnica del Ejército, Sangolquí, Ecuador. 2011. pp. 4-29. [Consulta: 21 noviembre 2019]. Disponible en: <https://www.bibliotecasdelecuador.com/Record/ir-:21000-4923>.

MORTON, E.R.; & FUQUA, C. "Laboratory maintenance of *Agrobacterium*". *Current Protocols in Microbiology*, vol. 1, (2012), (United State of America) pp. 1-8. ISSN 1934-8533. DOI 10.1002/9780471729259.mc03d01s24.

MOUGEL, C.; et al. "Novel tellurite-amended media and specific chromosomal and Ti plasmid probes for direct analysis of soil populations of *Agrobacterium* biovars 1 and 2". *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 67, n° 1 (2001), (Francia) pp. 65-74. ISSN 0099-2240. DOI 10.1128/AEM.67.1.65-74.2001.

NAVARRETE, R.; et al. "Bacterias Fitopatógenas en Semillas: Su Detección y Regulación". *Revista Mexicana de Fitopatología*, vol. 32, n° 2 (2014), (México) pp. 75-88. ISSN 2007-8080.

NCBI. *BLAST: Basic Local Alignment Search Tool*. [en línea]. [Consulta: 4 enero 2021]. Disponible en: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

NHGRI. *Electroforesis* / *NHGRI. Genome.gov* [en línea]. [Consulta: 4 enero 2021]. Disponible en: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Electroforesis>.

OH, P.M. Comparison of two selective media for the isolation of *Agrobacterium tumefaciens* from the soil [en línea] (Trabajo de titulación). (Pregrado) Universiti Tunku Abdul Rahman, Faculty of Science, Kampar, Malasia. 2014. pp. 01-20. [Consulta: 11 noviembre 2019]. Disponible en: <http://eprints.utar.edu.my/1244/>.

PRESCOTT, L. M.; et al. *Microbiology* [en línea]. 5th. Colorado-USA: McGraw-Hill, 2002. ISBN 978-0-07-248522-6. [Consulta: 26 junio 2019] Disponible en: <https://books.google.com.ec/books?id=0uBBPgAACAAJ>.

PULAWSKA, J.; et al. "Rapid and specific identification of four *Agrobacterium* species and biovars using multiplex PCR". *Systematic and Applied Microbiology*, vol. 29, n° 6 (2006), (Polonia), (Bélgica) pp. 470-479. ISSN 0723-2020. DOI 10.1016/j.syapm.2005.11.002.

REAL ACADEMIA DE INGENIERÍA. Cicloheximida. *RAIN* [en línea]. [Consulta: 4 enero 2021]. Disponible en: <http://diccionario.raing.es/es/lema/cicloheximida>.

RESTREPO, S.; & VARGAS, Á. "Biotecnología: herramienta de diagnóstico de enfermedades en plantas". *Palmas*, vol. 28, n° 1 (2007), (Colombia) pp. 366-372.

RHOUMA, A.; et al. "Plasmid and Chromosomal Diversity of a Tunisian Collection of *Agrobacterium tumefaciens* Strains". *Tunisian Journal of Plant Protection*, vol. 1, n° 2 (2006), (Túnez) pp. 73-84.

RODICIO, M. del R.; & MENDOZA, M. del C. "Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica". *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, vol. 22, n° 4 (2004), (España) pp. 238-245. ISSN 0213-005X.

SHAMS, M.; et al. *Rapid and Efficient Methods to Isolate, Type Strains and Determine Species of Agrobacterium spp. in Pure Culture and Complex Environments, Biochemical Testing* [en línea]. Croacia: InTech 2012. [Consulta: 29 octubre 2019]. ISBN 978-953-51-0249-6. Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/biochemical-testing/rapid-and-efficient-methods-toisolate-type-strains-and-determine-species-of-agrobacterium-spp-in-pu>.

SMITH, E.; & TOWNSEND, C. "A plant-tumor of bacterial origin". *Science*, vol. 25, n° 643 (1907), (United State of America) pp. 671-673. DOI 10.1126/science.25.643.671.

SZEGEDI, E.; et al. "Characterization of *Agrobacterium tumefaciens* strains isolated from grapevine". *Vitis*, vol. 44, n° 1 (2005), (Hungría) pp. 49-54.

TEMPÉ, J.; et al. "Thermosensitive step associated with transfer of the Ti plasmid during conjugation: Possible relation to transformation in crown gall". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 74, n° 7 (1977), (United State of America) pp. 2848-2849. ISSN 0027-8424. DOI 10.1073/pnas.74.7.2848.

TIWARY, B.N.; et al. "Characterization of Two Novel Biovar of *Agrobacterium tumefaciens* Isolated from Root Nodules of *Vicia faba*". *Current Microbiology*, vol. 55, n° 4 (2007), (India) pp. 328-333. ISSN 1432-0991. DOI 10.1007/s00284-007-0182-2.

TOLBA, I.; & SOLIMAN, M. "Phenotypic and Molecular Characterization of Tumorigenic *Agrobacterium tumefaciens* Strains Isolated from Rose Plant in Egypt". *Middle East Journal of Agriculture Research*, vol. 3, n° 4 (2014), (Egipto) pp. 1002-1014. ISSN 2077-4605.

VALDERRAMA, A.; et al. "Transformación de plantas mediada por *Agrobacterium*: «ingeniería genética natural aplicada»". *Revista Facultad Nacional de Agronomía*, vol. 58, n° 1 (2005), (Colombia) pp. 2569-2585. ISSN 0304-2847.

VOET, D.; et al. *Fundamentos De Bioquímica/ Fundamental of Biochemistry* [en línea]. 2nd. Madrid-España: Ed. Médica Panamericana S.A., 2007. [Consultada: 27 junio 2019]. ISBN 978-950-06-2314-8.

Disponible en:

<https://books.google.com.co/books?id=FXDiqLK6GmAC&printsec=frontcover&dq=libros+bioquímica+online+gratis&source=bl&ots=UqIAEjW0PK&sig=jRaUKwRRPvbErBPRCc3xAAEY-lY&hl=es&sa=X&ei=svd0UNqaN4qi8ASWj4H4Dg#v=onepage&q&f=false>.

WETZEL, M.; et al. "Quorum-Dependent Mannopine-Inducible Conjugative Transfer of an *Agrobacterium* Opine-Catabolic Plasmid". *Journal of Bacteriology*, vol. 196, n° 5 (2014), (United State of America) pp. 1031-1044. ISSN 0021-9193, 1098-5530. DOI 10.1128/JB.01365-13.

XU, J.; et al. "Genetic analysis of *Agrobacterium tumefaciens* unipolar polysaccharide production reveals complex integrated control of the motile-to-sessile switch". *Molecular Microbiology*, vol. 89, n° 5 (2013), (United State of America) pp. 929-948. ISSN 1365-2958. DOI 10.1111/mmi.12321.

YOUNG, J.M.; et al. Agrobacterium. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* [en línea]. Auckland-Nueva Zelanda: American Cancer Society, 2015. pp. 1-15. [Consulta: 24 agosto 2020]. ISBN 978-1-118-96060-8. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781118960608.gbm00842>.

ANEXOS

ANEXO A: ELABORACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO SEMI-SELECTIVOS.



Determinación de pH en medio D1.



Erlenmeyer con medios de cultivo de sales AT y D1.



Adición de cicloheximida en medio D1.



Placas petri dispensadas con medio de sales AT y D1.

ANEXO B: ESTERILIZACIÓN Y MACERACIÓN DEL TEJIDO VEGETAL.



Tallo de rosa con presencia de tumores en la corona.



Plantas en solución de hipoclorito de sodio al 1%.



Tumores depositados en discos de papel filtro siendo secados con mechero de alcohol.

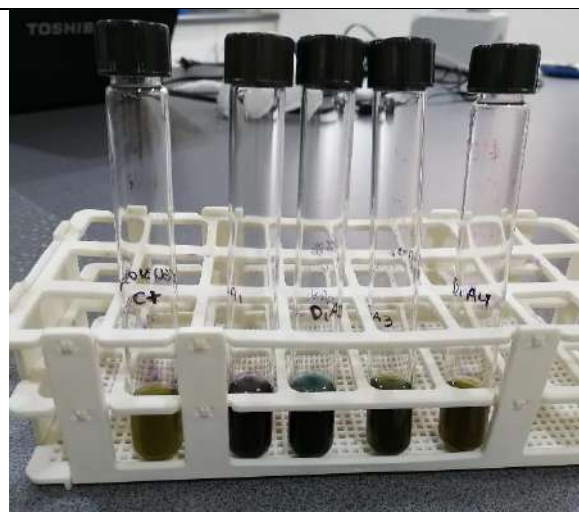


Tubos eppendorf con macerado de tejido tumoral.

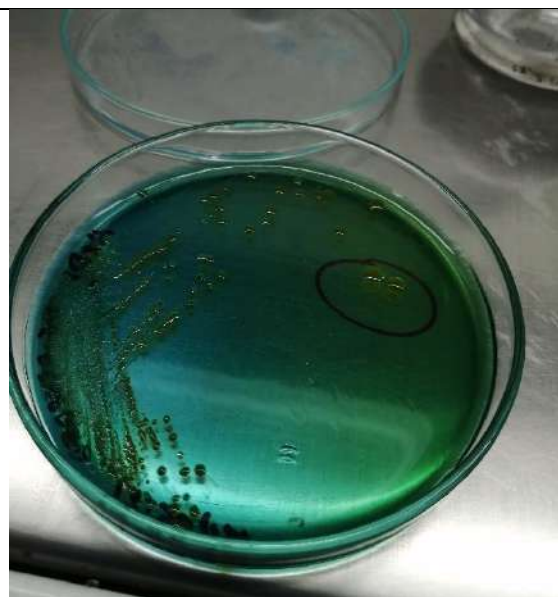
ANEXO C: SIEMBRA E INCUBACIÓN DE PLACAS.



Siembra en medio semi-selectivo D1 de color azul.



Tubos de ensayo con caldo D1 presentan coloración entre verde oliva y azul intenso.



Placa de medio D1 a los 4 días de incubación, presenta colonias circulares, color verde oliva.



Medio D1 inoculado con caldo enriquecido a los 4 días de incubación, presenta colonias circulares azules y colonias amarillas de borde irregular.

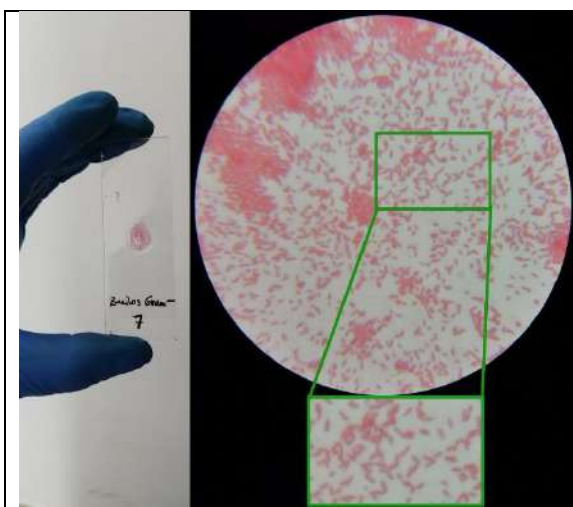
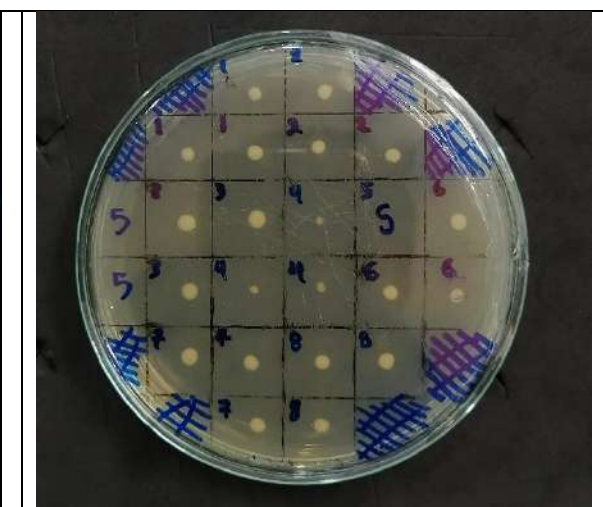


Cepas control ATGU3101A 1 y 2, colonias aisladas de color beige y blancas en agar LB.

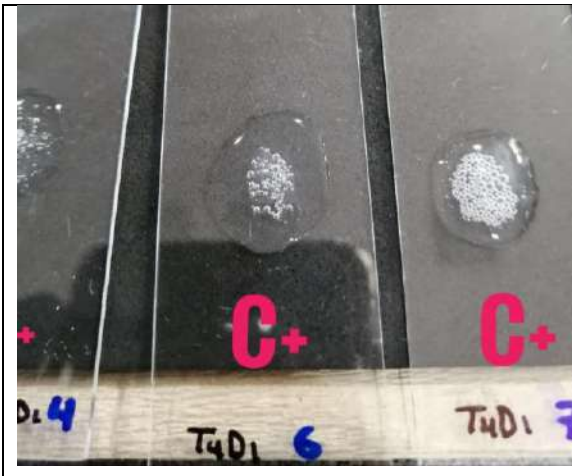
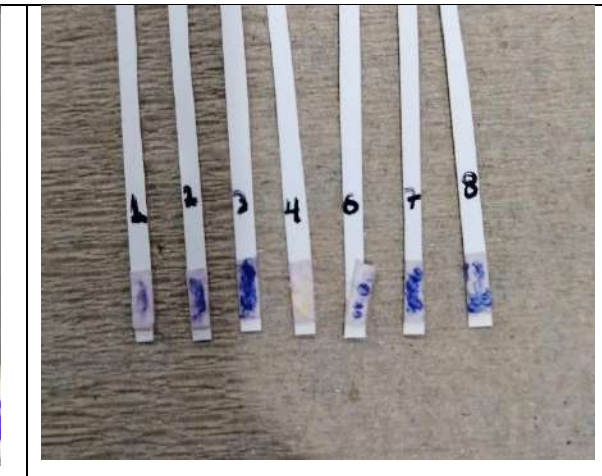
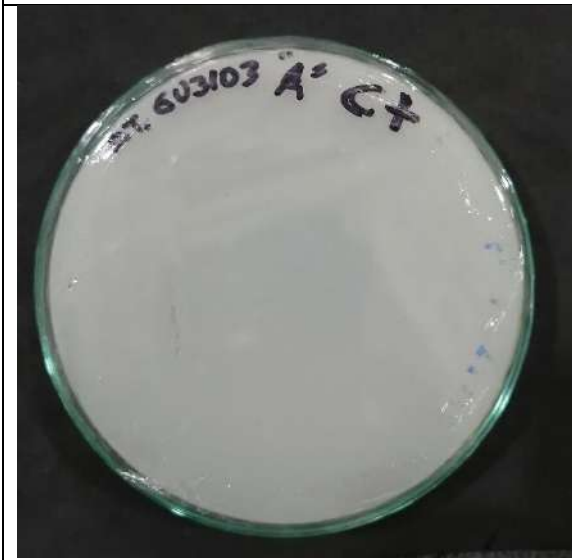
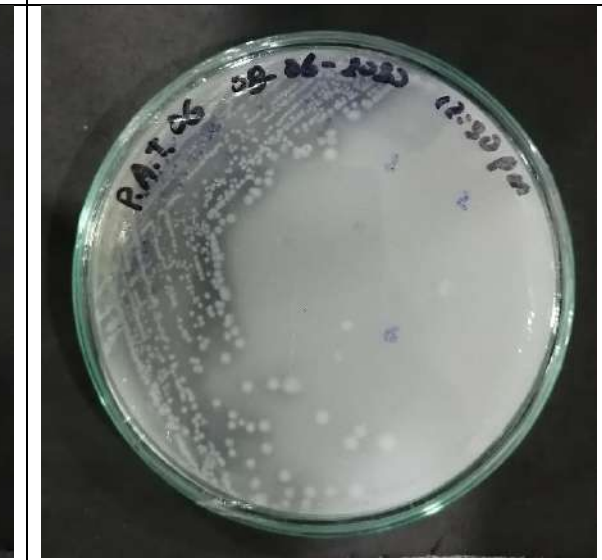


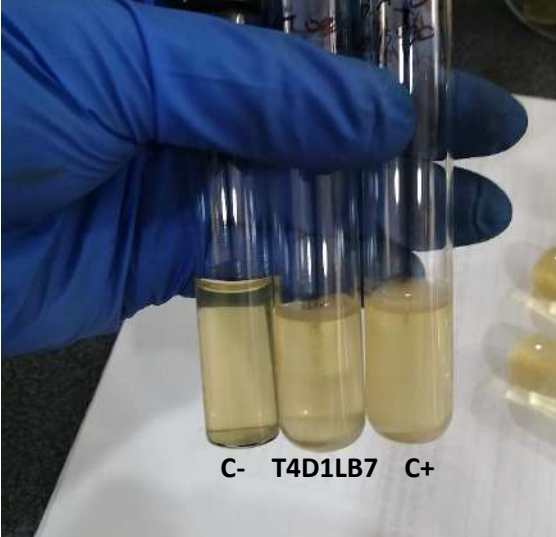
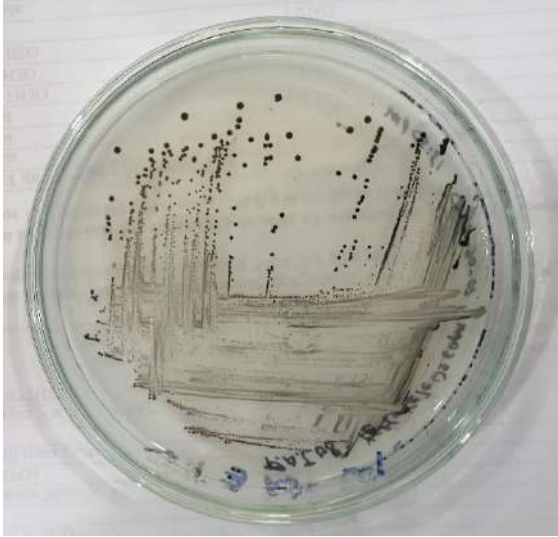

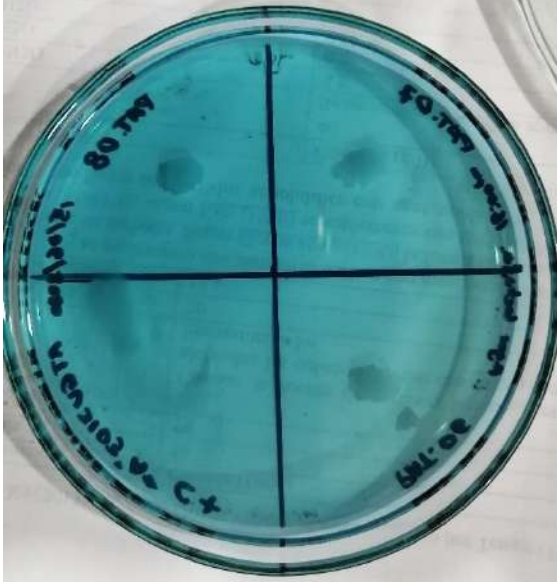
colonias aisladas de color beige y blancas en agar LB, pertenecen a los aislados del tejido tumoral.

ANEXO D: TINCIÓN GRAM Y REPIQUE EN CUADRICULA.

	
<p>Frotis de bacilos Gram negativos visto en microscopio óptico con aumento de 100X</p>	<p>Clones bacterianos repicados por triplicado en cuadrículas sobre agar LB</p>

ANEXO E: REGISTRO FOTOGRÁFICO DE PRUEBAS BIOQUÍMICAS.

	
<p>Cepas bacterinas positivas para la prueba de la catalasa</p>	<p>Cepas bacterinas positivas para la prueba de la oxidasa</p>
	
<p>Ceba ATGU3101A en agar PDA-CaCO₃, no presenta zonas de aclaramiento ácido.</p>	<p>Ceba PAT06 en agar PDA-CaCO₃, presenta zonas de aclaramiento ácido.</p>

 <p>C- T4D1LB7 C+</p>	
<p>Tubos de nesayo con medio SIM, no presenta pigmenacion.</p>	<p>Placa de agar YEM-K2TeO3, colonias circulares, convexas de color negro metalico.</p>
	
<p>Placa de agar YEM-K2TeO3, masa bacteriana color gris.</p>	<p>Placa de agar lactosa, inundada con reactivo de benedict, sin presencia de precipiado color rojo ladrillo .</p>

ANEXO F: REGISTRO FOTOGRÁFICO DE CARACTERIZACIÓN MOLECULAR.



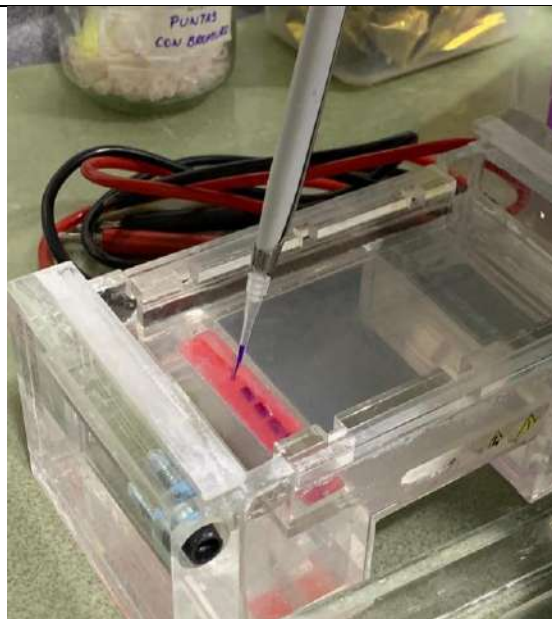
Tubo eppendorf conteniendo una solución transparente separada por una interface blanca.



NanoDrop 2000 con cabezal levantado.



Termociclador corriendo un programa de PCR.



Gel de agarosa en cámara de electroforesis siendo cargado.

ANEXO G: SECUENCIA DE LA CEPA PAT07 REALIZADA POR MACROGEN.





ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

**DIRECCIÓN DE BIBLIOTECAS Y RECURSOS PARA EL
APRENDIZAJE Y LA INVESTIGACIÓN**



UNIDAD DE PROCESOS TÉCNICOS
REVISIÓN DE NORMAS TÉCNICAS, RESUMEN Y BIBLIOGRAFÍA

Fecha de entrega: 22 / 01 / 2021

INFORMACIÓN DEL AUTOR/A (S)
Nombres – Apellidos: Jhonatan Wladimir Tandapilco Llunitaxi
INFORMACIÓN INSTITUCIONAL
Facultad: Ciencias
Carrera: Ingeniería en Biotecnología Ambiental
Título a optar: Ingeniero en Biotecnología Ambiental
f. Analista de Biblioteca responsable: Lic. Luis Caminos Vargas Mgs.



Firmado electrónicamente por:
**LUIS ALBERTO
CAMINOS
VARGAS**



0540-DBRAI-UPT-2020